

Université de Montréal

**Un nouveau rôle de la voie Hippo dans la synthèse des gonadotrophines**

Par ARIANE LALONDE-LARUE

Département de biomédecine  
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)  
en sciences vétérinaires, option reproduction

Avril 2021

©Ariane Lalonde-Larue, 2021

*Ce mémoire intitulé*

**Un nouveau rôle de la voie Hippo dans la synthèse des gonadotrophines**

*Présenté par*  
**Ariane Lalonde-Larue**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Jacques Lussier**  
Président-rapporteur

**Gustavo Zamberlam**  
Directeur de recherche

**Derek Boerboom**  
Codirecteur

**Alexandre Boyer**  
Codirecteur

**Imourana Alassane-Kpembé**  
Membre du jury

## Résumé

L'hypophyse est une glande endocrine responsable de la régulation de nombreux processus physiologiques, notamment la reproduction, par la sécrétion des gonadotrophines, la FSH et la LH. Ces hormones sont des glycoprotéines dimériques composées d'une sous-unité  $\alpha$  commune (CGA) et de sous-unités  $\beta$  uniques (LH $\beta$  et FSH $\beta$ ), qui confèrent une spécificité biologique. La synthèse de la FSH et la LH au niveau des cellules gonadotropes dépend entre autres de l'expression génique de gènes clés tels que *Fshb* et *Lhb*, dont la transcription est régulée par différents facteurs. La GnRH, produite par l'hypothalamus, en est la principale régulatrice, mais d'autres facteurs tels que les activines, qui signalent via des protéines nommées SMAD, participent à cette régulation. L'activité de la voie SMAD peut être modifiée par des interactions avec la voie Hippo dans plusieurs tissus et types de cellules, mais l'implication de la voie Hippo dans la régulation de la synthèse des gonadotrophines n'a jamais été investiguée. La voie de signalisation Hippo est une cascade de kinases qui contrôle l'activité des corégulateurs transcriptionnels fonctionnellement redondants YAP et TAZ. Afin d'élucider les rôles de YAP/TAZ dans la synthèse et la sécrétion de gonadotrophines, nous avons utilisé une approche de ciblage génique conditionnel (cKO) afin de causer la délétion de *Yap/Taz* spécifiquement dans les cellules gonadotropes. Nous avons constaté que cette délétion entraînait une augmentation de la sécrétion de la FSH et la LH chez les souris mâles, ainsi qu'une légère augmentation de la densité des spermatozoïdes. Les souris femelles cKO avaient des taux plus élevés de la LH sérique (mais pas de la FSH), qui étaient associés à un phénotype d'hyperfertilité caractérisé par des taux d'ovulation plus élevés et des portées plus nombreuses. Étonnamment, la perte de YAP/TAZ dans les gonadotropes n'a pas semblé affecter les gènes clés liés à la synthèse des gonadotrophines, mais la sécrétion de la LH basale et induite par la GnRH a augmenté dans les cellules hypophysaires de souris cKO cultivées *in vitro*. Les mêmes résultats ont été obtenus dans la lignée L $\beta$ T2, une lignée de cellules gonadotropes immortalisées lorsque l'action de YAP/TAZ fut inhibée pharmacologiquement. Ensemble, ces résultats indiquent que YAP/TAZ suppriment la sécrétion des gonadotrophines (en particulier de la LH) dans les cellules gonadotropes et révèlent donc un tout nouveau rôle de la voie Hippo dans la reproduction chez mammifères.

**Mots-clés :** YAP, TAZ, gonadotrophines, souris cKO, fertilité.

## Abstract

The pituitary gland is responsible for regulating many physiological processes. Through the secretion of gonadotropins FSH and LH, the pituitary is considered a major regulator of reproduction. These hormones are dimeric glycoproteins composed of a common  $\alpha$  subunit (CGA) and unique  $\beta$  subunits (LH $\beta$  and FSH $\beta$ ), which confer biological specificity. The synthesis of FSH and LH at pituitary gonadotrope cells depends mostly on the expression of key genes as *Fshb* and *Lhb*. GnRH, produced by the hypothalamus, is the primary regulator, but other factors such as activins, which signal through proteins called SMADs, participate in this regulation. The activity of the SMAD pathway can be altered by crosstalk with the Hippo pathway in several tissues and cell types, but whether the Hippo pathway is involved in regulating gonadotropin synthesis has not been determined. The core Hippo signaling pathway consists of a kinase cascade that regulates the activity of the functionally redundant transcriptional co-regulators YAP and TAZ. To elucidate the roles of YAP/TAZ in gonadotropin synthesis and secretion, we decided to use a conditional gene targeting approach (cKO), which allowed us to promote the depletion of *Yap/Taz* specifically in the gonadotrope cells. Such conditional deletion resulted in increased circulating levels of FSH and LH in male mice, along with a slight sperm density increase. cKO female mice had augmented circulating LH (but not FSH) levels, which were associated with a hyperfertility phenotype characterized by higher ovulation rates and larger litter sizes. Surprisingly, the loss of YAP/TAZ in gonadotropes did not appear to affect key gonadotropin synthesis-related genes, but both basal and GnRH-induced LH secretion was increased in pituitary cells from cKO mice cultured *in vitro*. Similar results were obtained using pharmacological inhibition of YAP/TAZ in L $\beta$ T2 gonadotrope-like cells *in vitro*. Together, these results indicate that YAP/TAZ suppress gonadotropin release (particularly LH) in gonadotrope cells and reveal a completely novel role of the Hippo pathway in mammalian reproduction.

**Keywords:** YAP, TAZ, gonadotropins, cKO mice, fertility.

# Table des matières

Résumé .....	3
Abstract.....	4
Table des matières .....	5
Listes des tableaux.....	9
Liste des figures .....	10
Liste des sigles et des abréviations.....	12
Remerciements.....	16
Introduction.....	17
Chapitre 1. Recension de la littérature.....	19
1. L'hypophyse.....	19
1.1 Le développement de l'hypophyse .....	19
1.2 L'anatomie et la fonction de l'hypophyse.....	20
1.2.1 L'adénohypophyse .....	22
1.2.1.1 Cellules thyroïdiques.....	23
1.2.1.2 Cellules lactotropes .....	23
1.2.1.3 Cellules corticotropes .....	23
1.2.1.4 Cellules somatotropes.....	24
1.2.1.5 Cellules gonadotropes .....	24
1.3 L'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique (HHG).....	25
1.3.1 Rôle de l'hypothalamus dans l'axe HHG .....	25
1.3.2 Rôle de l'hypophyse dans l'axe HHG.....	27
1.3.2.1. Le récepteur de la GnRH .....	27
1.3.2.2 La sécrétion des gonadotrophines .....	28
1.2.4 Les rôles clés des gonadotrophines dans l'axe HHG .....	30

1.2.4.1. La FSH.....	30
1.2.4.2 La LH.....	31
1.2.5 Rétrocontrôle de l'axe HHG.....	33
1.2.5.1 Le rétrocontrôle négatif par les hormones stéroïdiennes.....	33
1.2.5.2 Le rétrocontrôle négatif par les inhibines et activines.....	34
1.2.5.3 Les conséquences d'une mauvaise régulation des gonadotrophines.....	34
2. Régulation de la synthèse des gonadotrophines.....	35
2.1 La structure des gonadotrophines.....	35
2.2. La régulation génétique des gonadotrophines.....	36
2.2.1 Régulation de <i>Gnrhr</i> .....	36
2.2.2 Régulation de <i>Cga</i> .....	37
2.2.3 Régulation de <i>Lhb</i> .....	38
2.2.3.1 Expression de <i>Lhb</i> spécifique aux cellules gonadotropes dans l'hypophyse.....	38
2.2.3.2 Régulation de <i>Lhb</i> par GnRH.....	38
2.2.3.3 Régulation de <i>Lhb</i> par les activines.....	39
2.2.3.4 Régulation de <i>Lhb</i> par les hormones stéroïdiennes.....	40
2.2.4 Régulation de <i>Fshb</i> .....	40
2.2.4.1 Expression de <i>Fshb</i> spécifique aux cellules gonadotropes dans l'hypophyse.....	40
2.2.4.2 Régulation de <i>Fshb</i> par la GnRH.....	41
2.2.4.3 Régulation de <i>Fshb</i> par les activines.....	42
3. La voie Hippo.....	44
3.1 Généralités.....	44
3.1.1 Découverte de la voie de signalisation Hippo.....	44
3.1.2 Cascade de kinases.....	44
3.1.3 Les effecteurs de la voie Hippo.....	45

3.1.3.1 YAP .....	46
3.1.3.2 TAZ .....	46
3.1.3.3 Rétention cytoplasmique et dégradation.....	46
3.1.3.4 Translocation dans le noyau .....	47
3.1.4 Gènes cibles de la voie Hippo .....	47
3.1.5 Signaux en amont.....	48
3.1.5.1 Contacts, jonctions et matrice cellulaire.....	48
3.1.5.2 Les protéines de polarité cellulaire.....	49
3.1.5.3 Les facteurs solubles et récepteurs couplés aux protéines G .....	49
3.1.5.4 Le rôle du métabolisme cellulaire .....	49
3.2 Fonction chez les mammifères .....	50
3.2.1 Développement .....	50
3.2.2 Tumeurs.....	50
3.3 La voie Hippo dans l'hypophyse .....	51
4. Interactions possibles de la voie Hippo dans l'hypophyse .....	52
4.1 Hippo et TGFβ.....	52
4.1.1 YAP-TAZ et SMAD2/3-4 .....	52
4.1.2 YAP et SMAD7 .....	54
4.2 Hippo et Wnts.....	55
Chapitre 2. Hypothèse et objectif.....	56
Chapitre 3. Article en tant que première auteure .....	57
Abstract .....	58
Introduction .....	59
Materials and methods .....	60
Results.....	65

Discussion .....	69
Acknowledgments .....	72
References .....	72
Figures and figure legends .....	79
Tables .....	87
Chapitre 4. Discussion .....	89
1. Importance d'étudier la synthèse des gonadotrophines.....	89
2. Nouveau rôle de la voie Hippo dans l'hypophyse .....	89
3. Méthodes de recherche utilisées : avantages et limites. ....	90
3.1 Approches <i>in vitro</i> de base .....	91
3.2 Approche <i>in vivo</i> : système Cre-Lox .....	92
4. Résultats attendus, inattendus et « énigmes » identifiées dans le projet .....	94
Chapitre 5. Conclusions.....	99
Chapitre 6. Bibliographie.....	100



**Listes des tableaux**

**Résultats :**

Table 1. Genotyping primers ..... 87

Table 2. qPCR primers ..... 87

Table 3. Fertility trial..... 88

## Liste des figures

### Revue de littérature

Figure 1. Différentiation des lobes de l'hypophyse à partir de leur origine embryonnaire.....	20
Figure 2. Circulation endocrinienne de l'hypothalamus vers l'adénohypophyse et la neurohypophyse. ....	21
Figure 3. Les hormones de l'hypothalamus et l'hypophyse avec leurs organes cibles.....	22
Figure 4. La cascade de signalisation de GnRH .....	26
Figure 5. Distribution des granules sécrétrices de la FSH et LH sur des coupes d'hypophyses antérieures de moutons. ....	29
Figure 6. Représentation schématique de l'effet des gonadotrophines sur la spermatogénèse. ...	32
Figure 7. Représentation schématique de l'effet des gonadotrophines sur la folliculogénèse et l'ovulation .....	33
Figure 8. Représentation structurale de la FSH liée au domaine extracellulaire du récepteur de la FSH (ECD).....	36
Figure 9. Schématisation simplifiée de la régulation de <i>Lhb</i> par GnRH.....	39
Figure 10. Activation de la cascade des TGF $\beta$ par les activines.....	43
Figure 11. La cascade de kinases de la voie Hippo inactivée et activée .....	45
Figure 12. Séquestration du complexe SMAD2/3 dans le cytoplasme par YAP/TAZ .....	54

### Article

Figure 1. Gonadotrope-specific conditional knockout validation .....	79
Figure 2. Effects of gonadotrope specific <i>Yap/Taz</i> knockout in male mice.....	80
Figure 3. Effects of gonadotrope specific <i>Yap/Taz</i> knockout in female mice.....	82
Figure 4. Expression pattern of gonadotropin synthesis-related genes in whole pituitary gland.....	84
Figure 5. Basal and GnRH-induced LH secretion in pituitary cells from cKO mice.....	85
Figure 6. Effects of YAP/TAZ-TEAD interaction inhibition in LH release pattern in immortalized gonadotrope cell line.....	86

## **Discussion**

Figure 13. Utilisation du ciblage génique conditionnel (Cre-Lox) pour la création d'un modèle murin avec la délétion de *Yap/Taz* spécifiquement dans les cellules gonadotropes ..... 93

## Liste des sigles et des abréviations

AC	Adénylate cyclase
ACTH	Adrénocorticotropine – <i>Adrenocorticotropic hormone</i>
ADH	Hormone anti-diurétique – <i>Antidiuretic hormone</i>
AMOT	Angiomotines – <i>Angiomotin</i>
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANKRD1	Domaine 1 de répétition ankyrine – <i>Ankyrin repeat domain 1</i>
Ap-1	Protéine activatrice 1 – <i>Activating protein 1</i>
BIRC	Répétition baculoviral IAP contenant la protéine 5 – <i>Baculoviral IAP repeat containing 5</i>
BMP	Protéine morphogénétique osseuse – <i>Bone morphogenic protein</i>
CgA/CgB	Chromogranine A et B
CGA	Sous-unité alpha des gonadotrophines chorioniques – <i>Chorionic gonadotropin <math>\alpha</math>-subunit</i>
CK1 $\delta/\epsilon$	Kinase caséine 1 – <i>Casein kinase I</i>
cKO	Invalidation conditionnelle des gènes – <i>Conditional knockout</i>
COX2	Cyclooxygénase 2
CRB	Protéine Crumbs – <i>Crumbs</i>
Cre-lox	Recombinase Cre ciblant les site loxP
CREB	Protéine se fixant aux éléments de réponse à l'adénosine monophosphate cyclique – <i>cAMP response element binding protein</i>
CRH	Corticolibérine - <i>Corticotropin-releasing hormone</i>
CTGF	Facteur de croissance du tissu conjonctif – <i>Connective tissue growth factor</i>
CTNNB1	Bêta-caténine – <i>Beta-Catenin</i>
CYP19a1	Aromatase cytochrome P450 – <i>Cytochrome aromatase P450</i>
CYR61	Induction angiogénique riche en cystéine 61 – <i>Cysteine-rich angiogenic inducer 61</i>
DAG	Diacylglycérol – <i>Diacylglycerol</i>
DHEA	Déhydroépiandrosterone – <i>Dehydroepiandrosterone</i>
DVL	Échevelée – <i>Dishevelled</i>

e	Jour embryonnaire
EGR1	Réponse de croissance précoce 1 – <i>Early Growth Response 1</i>
ER	Récepteur de l'œstrogène – <i>Estrogen receptor</i>
ERK	Kinases régulées par des signaux extracellulaires – <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FAT	Cadhérine atypique FAT – <i>FAT Atypical Cadherin</i>
FGF	Facteur de croissance de fibroblaste – <i>Fibroblast growth factor</i>
flox	Encadré de séquences loxP
FOXL2	Boîte de tête de fourche L2 – <i>Forkhead box L2</i>
FSH	Hormone folliculostimulante – <i>Follicle-stimulating hormone</i>
FSH $\beta$	Sous-unité bêta de FSH – <i>FSH beta subunit</i>
FSH-R	Récepteur de l'hormone folliculo-stimulante – <i>Follicle-stimulating hormone receptor</i>
GATA2	Protéine de liaison GATA 2 – <i>GATA binding protein 2</i>
GBF-A1/A2/B1	Facteur de liaison de boîte G – <i>G-Box binding factor</i>
GH	Hormone de croissance – <i>Growth hormone</i>
GHIH	Somatostatine – <i>Growth hormone inhibiting hormone</i>
GHRH	Somatolibérine – <i>Growth hormone releasing hormone</i>
GHRHR	Récepteur de la somatolibérine – <i>Growth hormone releasing hormone receptor</i>
GnRH	Gonadolibérine – <i>Gonadotropin releasing hormone</i>
GnRHR	Récepteur de la gonadolibérine – <i>Gonadotropin releasing hormone receptor</i>
Gq/11	Protéine Gq/11 – <i>Gq/11 protein</i>
GSU	Sous-unité de glycoprotéine – <i>Glycoprotein subunit</i>
HHG	Axe hypothalamo-hypophyso-gonadique
Hpo	Gène Hippo – <i>Hippo gene</i>
H-2K <sup>k</sup>	Antigène de surface murin
IP3	Inositol triphosphate
JNK	Kinase c-Jun N-terminale – <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LATS1/2	Grand suppresseur de tumeur – <i>Large tumor suppressor</i>

LβT2	Cellules gonadotropes murines matures immortalisées
LH	Hormone lutéinisante – <i>Luteinizing hormone</i>
LHβ	Sous-unité bêta de LH – <i>FSH beta subunit</i>
LHX3	Gène homeobox LIM 3 – <i>LIM Homeobox gene 3</i>
LH-R	Récepteur de l'hormone lutéinisante – <i>Luteinizing hormone receptor</i>
LPA	Acide lysophosphatidique – <i>Lysophosphatidic acid</i>
MAPK	Protéines kinases activées par des mitogènes – <i>Mitogen-activated protein kinases</i>
Mats	Suppresseur de tumeur Mob – <i>Mob as tumor suppressor</i>
<i>Mob1</i>	Activateur de kinase Mob – <i>MOB kinase activator 1</i>
MSH	Hormone mélanotrope – <i>Melanocyte stimulating hormone</i>
MST1/2	Protéines mammifères kinases STE20 1 et 2 – <i>Mammalian STE20 like protein kinase 1 or 2</i>
NR5A1/2	Récepteur nucléaire de la sous-famille 5, groupe A, member 1 ou 2 – <i>Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1 or 2</i>
pARNi	Petit ARN interférant
PITX1/PITX2	Protéine pairée comme homéodomaine 1 et 2 – <i>Paired Like Homeodomain 1 and 2</i>
POMPc	Proopiomélanocortine – <i>proopiomelanocortin</i>
PR	Récepteur de la progesterone – <i>Progesterone receptor</i>
PRL	Prolactine – <i>prolactin</i>
PTPN4	Protéine tyrosine phosphatase de type non récepteur 14 – <i>Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 14</i>
p38	Classe de MAPK
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G – <i>G protein coupled receptors</i>
Sav	<i>Salvador</i>
SAV1	Domaine WW de la famille salvador contenant la protéine 1 – <i>Salvador family WW domain containing protein 1</i>
SBE	Élément liant de Smad – <i>Smad binding element</i>
SCRIB	<i>Scribble</i>

SF1	Facteur stéroïdogénique 1 – <i>Steroidogenic factor 1</i>
SgII	Sécrétogranines II
SGK1	Kinase régulée par le sérum/les glucocorticoïdes 1 – <i>Serum/glucocorticoid regulated kinase 1</i>
SH3	Domaine d'homologie SCR 3 – <i>SCR Homology 3 Domain</i>
T3	Triiodothyronine – <i>Triiodothyronin</i>
T4	Thyroxine– <i>Thyroxin</i>
TBE	Élément de liaison de TEAD – <i>TEAD binding element</i>
TEAD	Facteurs de transcription spécifiques à la séquence contenant de domaine TEA – <i>TEA domain-containing sequence-specific transcription factors</i>
TGFβ	Facteur de croissance transformant bêta – <i>Transforming growth factor beta</i>
TSH	Thyrotropine – <i>Thyroid stimulating hormone</i>
TAZ	Coactivateur transcriptionnel avec motif de liaison PDZ - <i>Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif</i>
VP	Vertéporfine – <i>Verteporfin</i>
<i>Wts</i>	<i>Warts</i>
YAP	Protéine <i>Yes</i> -associée - <i>Yes-associated-protein</i>
Yki	<i>Yorkie</i>
α-T3	Cellules gonadotropes murines immatures immortalisées
β-TRCP1/2	Protéines contenant des répétitions bêta-transducine – <i>Beta- Transducin repeat-containing proteins</i>

## Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr. Gustavo Zamberlam, pour son soutien, ses précieux conseils, sa patience, et surtout son enthousiasme et sa bonne humeur ! Ce fut un réel plaisir de travailler sous sa tutelle. Je voudrais aussi remercier mes codirecteurs, Dr. Derek Boerboom et Dr. Alexandre Boyer, pour leur contribution inestimable à la démarche scientifique de ce projet. Je remercie tous les membres des laboratoires Zamberlam, Boerboom, Boyer et Paquet ainsi que mes collègues du programme DMV-MSc, pour avoir su mêler humour et recherche au quotidien. Je souhaite également remercier mes parents, pour m'avoir transmis la soif d'apprendre et la passion pour la recherche.

Enfin, un merci très spécial à mon copain, Marc-André, pour m'avoir supportée et aidée tout au long de cette aventure.



## Introduction

La reproduction est un aspect fondamental de la vie, et sa régulation passe par des processus conservés au travers de l'évolution qui permettent la survie des espèces. L'endocrinologie est la clé de la régulation des organes reproducteurs ainsi que des comportements sexuels. Les hormones assurent la communication entre le cerveau et les organes reproducteurs, et permettent l'obtention des conditions optimales dont dépend la fertilité. L'hypothalamus et l'hypophyse sont les grands orchestrateurs de la reproduction. L'hypophyse est responsable de la synthèse et de la sécrétion des hormones folliculo-stimulante (FSH) et lutéinisante (LH), qui sont essentielles à la fertilité.

Les gonadotrophines, la FSH et la LH, sont des hormones responsables à la fois du développement périnatal et postnatal et du maintien des organes reproducteurs. Elles sont absolument indispensables à la fertilité des mammifères, que ce soit pour les mâles ou pour les femelles. Chez les mâles, elles permettent la spermatogenèse, et chez les femelles, la folliculogénèse et l'ovulation. Elles stimulent également les cellules des organes reproducteurs à produire leurs propres hormones, soit la testostérone, les œstrogènes et la progestérone. La FSH et la LH sont des glycoprotéines composées de deux sous-unités, soit la sous-unité alpha, commune aux deux hormones et la sous-unité bêta, qui leur confère leur spécificité. Ces sous-unités sont synthétisées par les cellules gonadotropes qui représentent environ 10 % de la population de cellules composant le lobe antérieur de l'hypophyse, ou l'adénohypophyse. La régulation de leur sécrétion provient de différentes sources : l'hypothalamus, les cellules gonadotropes elles-mêmes et les hormones sécrétées par les organes reproducteurs. Parmi les signaux émis par les cellules gonadotropes, les activines, de la grande famille des TGF $\beta$ s, sont bien reconnues de par leur capacité à stimuler la synthèse de FSH $\beta$ . Nous connaissons certains signaux de régulation, mais le mécanisme moléculaire des cellules gonadotropes permettant la traduction de ses signaux en la synthèse de gonadotrophines demeure encore à découvrir.

La voie Hippo, une voie hautement conservée dans l'évolution, est retrouvée dans de nombreuses cellules et occupe plusieurs rôles, notamment dans le contrôle de la croissance et de la prolifération cellulaire. Elle participe à l'homéostasie des tissus et la régulation de la taille des organes. Il s'agit d'une cascade de kinases qui se termine par la phosphorylation des effecteurs

finaux, YAP et TAZ. La présence des effecteurs de la voie Hippo a récemment été démontrée dans les cellules de l'hypophyse, mais aucun rôle fonctionnel ne lui a encore été attribué spécifiquement dans les cellules gonadotropes. L'objectif de cette étude fut de déterminer le rôle physiologique des effecteurs de la voie Hippo, YAP et TAZ, dans la régulation de la synthèse des gonadotrophines dans les cellules gonadotropes de l'hypophyse antérieure. À l'aide du ciblage génique conditionnel, nous avons créé un modèle de souris ayant subi la délétion de *Yap/Taz* spécifiquement dans les cellules gonadotropes, nous permettant d'étudier le rôle des effecteurs de la voie Hippo dans un contexte *in vivo*. D'autre part, des cultures primaires de cellules d'hypophyse et une lignée de cellules gonadotropes murines immortalisée (L $\beta$ T2) nous ont permis d'étudier les gonadotropes *in vitro*, affranchies de toute influence physiologique.

# Chapitre 1. Recension de la littérature

## 1. L'hypophyse

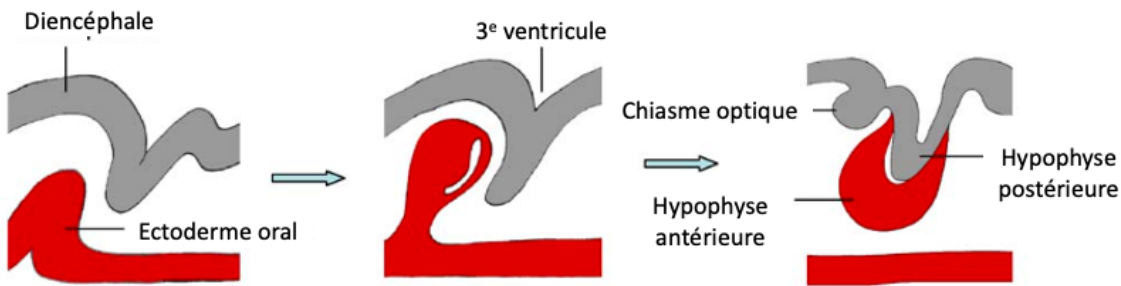
L'hypophyse est une glande endocrine située à la base de l'hypothalamus. Elle se situe plus précisément dans la selle turcique à la base du crâne. Elle est composée de trois lobes, soit les lobes antérieur, intermédiaire et postérieur.

### 1.1 Le développement de l'hypophyse

Les trois lobes de l'hypophyse sont anatomiquement adjacents, mais ils ne proviennent pas des mêmes tissus embryonnaires. Tandis que le lobe postérieur est formé à partir d'une évagination de tissu neural provenant du diencéphale (ectoderme neural) se dirigeant ventralement, tandis une invagination des cellules embryonnaires provenant de l'oropharynx (ectoderme oral) se dirigeant dorsalement, vers le cerveau forme la poche de Rathke, le précurseur des lobes intermédiaire et antérieur. Cette différence d'origine se reflète dans leur fonction et leur relation avec l'hypothalamus (1,2) (Figure 1).

La formation et l'organisation de l'hypophyse à partir de la poche de Rathke sont orchestrées par plusieurs facteurs de transcriptions, notamment BMP4, FGF8, FGF10. La formation de la poche de Rathke de souris déficientes en BMP4 (*bone morphogenic protein 4*) s'interrompt au jour embryonnaire 9.5 (e) (3). L'expression de BMP4 est remplacée par celle de FGF8 et FGF10 (*fibroblast growth factor*) au 10.5e chez la souris. Ces facteurs sont exprimés durant toute la phase active d'expansion de l'hypophyse (11.5e-14.5e)(1). La poche de Rathke de souris déficientes en FGF10 se retrouve en apoptose, indiquant un rôle de FGFs dans la survie de l'hypophyse(4). Finalement, la voie des Wnts est également déterminante dans le développement normal de l'hypophyse. Cette voie se divise en 2 catégories : la voie canonique, médiée par la  $\beta$ -Caténine; et la voie non canonique (WNT5), toutes deux impliquées dans le développement hypophysaire. Des souris n'exprimant pas WNT5, produisent une poche de Rathke disproportionnée et dimorphique. En supprimant le gène  *$\beta$ -caténine* dans le diencéphale ventral, on obtient une poche de Rathke de taille réduite et une diminution de l'expression de FGF8 (5).

Le processus de morphogenèse de l'hypophyse est similaire pour toutes les espèces vertébrées étudiées, entre autres des poissons, des amphibiens, des oiseaux et des rongeurs (6). Par contre, l'importance des différents lobes varie selon les espèces. Par exemple, le lobe intermédiaire chez l'Humain disparaît presque complètement lors de l'embryogenèse, ne laissant essentiellement que deux lobes (7). Les hormones sécrétées par l'hypophyse jouent des rôles essentiels par rapport à la reproduction, à la croissance et dans le maintien de l'homéostasie.



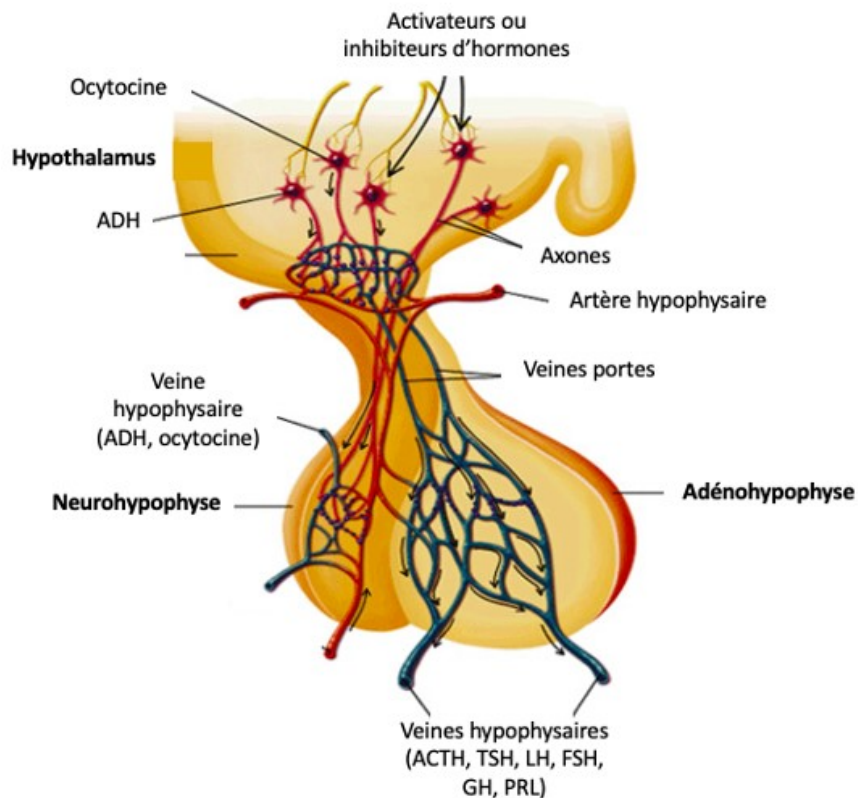
**Figure 1. Différenciation des lobes de l'hypophyse à partir de leur origine embryonnaire (modifiée de 8)**

## 1.2 L'anatomie et la fonction de l'hypophyse

Le lobe postérieur ou neurohypophyse est une continuité de l'hypothalamus. Il contient les projections axonales terminales des neurones magnocellulaires dont les corps se trouvent dans les noyaux paraventriculaires et supraoptiques de l'hypothalamus. Ces neurones sécrètent l'hormone anti-diurétique (ADH) et l'ocytocine. Ces deux hormones sont produites dans l'hypothalamus, traversent le lobe postérieur et se retrouvent dans la circulation veineuse à la sortie de la neurohypophyse (Figure 2). À l'inverse de l'adénohypophyse qui produit ses propres hormones, les hormones sécrétées par la neurohypophyse sont en fait produites par l'hypothalamus. La régulation de la sécrétion de l'ADH et l'ocytocine est influencée par la volémie ainsi que la gestation et la lactation, bien que ces mécanismes ne soient pas encore complètement élucidés (9,10).

Le lobe intermédiaire est quant à lui un tissu relativement homogène dont les cellules produisent l'hormone mélanotrope (MSH), responsable de stimuler les cellules pigmentaires à produire la mélanine en présence de rayons UV (1).

Le lobe antérieur, aussi appelé adénohypophyse, représente près des deux tiers du volume total de l'hypophyse. Il est constitué de différents types de cellules qui sécrètent plusieurs hormones, soit la thyrotropine (TSH), la prolactine (PRL), l'adrénocorticotropine (ACTH), la FSH, la LH et l'hormone de croissance (GH), en réponse à des signaux provenant de l'hypothalamus. Les signaux sécrétés par les neurones de l'hypothalamus passent dans la circulation veineuse pour atteindre les cellules de l'adénohypophyse grâce à un système porte. Les hormones ainsi produites quittent le système nerveux central pour stimuler l'activité endocrinienne d'autres organes (Figure 2)(11).



**Figure 2. Circulation endocrinienne de l'hypothalamus vers l'adénohypophyse et la neurohypophyse (modifiée de 11).**

En général, la sécrétion hormonale de l'adénohypophyse est régulée par trois mécanismes : la libération d'hormones activatrices ou inhibitrices par l'hypothalamus, la sécrétion de facteurs paracrines et autocrines intra hypophysaires et le rétrocontrôle par les organes cibles des hormones hypophysaires. La sécrétion de ces hormones se fait soit de manière pulsatile ou épisodique (8,11).

### 1.2.1 L'adénohypophyse

L'adénohypophyse est constituée de cinq types de cellules neuroendocriniennes, qui sont distribués soit régionalement, soit aléatoirement à travers la glande, ce qui ne facilite pas leur identification. Les différents types de cellules proviennent d'une même cellule progénitrice différenciée grâce à des facteurs de transcription spécifiques (1). Malgré leur origine commune, ces cellules sont très différentes d'un point de vue fonctionnel. Chacun des types de cellules est stimulé par un signal spécifique de l'hypothalamus et sécrète une ou deux hormones qui lui sont propres (Figure 3) (1,2). Ces 5 types cellulaires sont communs à tous mammifères étudiés, mais la proportion qu'occupe chaque type cellulaire est variable selon les espèces et également selon la demande physiologique de l'individu. Par exemple, le nombre de cellules exprimant la prolactine varie alternativement à la hausse et à la baisse lors la gestation, la lactation et le sevrage. Aussi, le nombre de cellules exprimant l'hormone de croissance augmente lors de la puberté (12). Chez le rat, le nombre de cellules gonadotropes augmente 1 à 2 semaines suivant une orchidectomie (13). L'adénohypophyse est également constituée de cellules non endocrines qui servent à supporter le tissu.

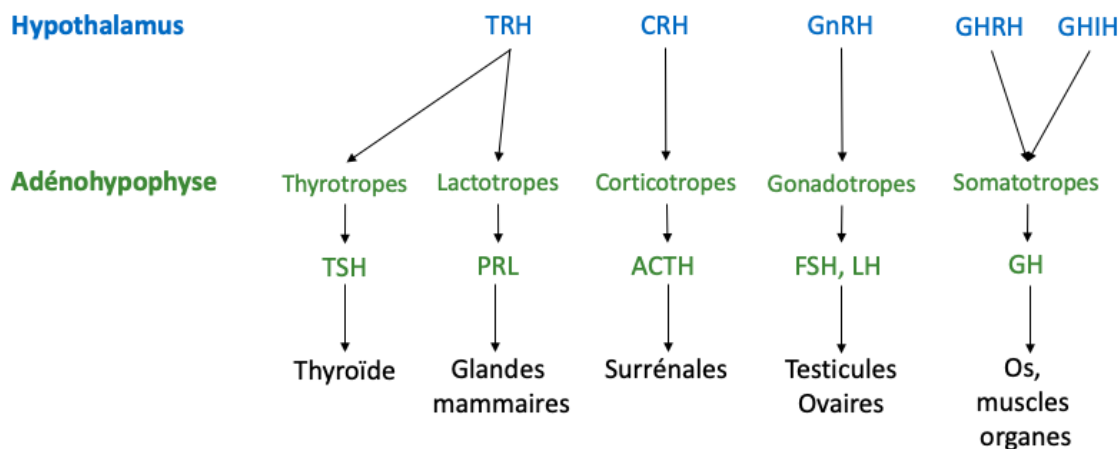


Figure 3. Les hormones de l'hypothalamus et l'hypophyse avec leurs organes cibles (Figure originale).

### **1.2.1.1 Cellules thyroïdiques**

Les cellules thyroïdiques sont les cellules les moins abondantes dans l'adénohypophyse, représentant à peine 5 % de la population totale de cellules. Malgré leur faible nombre, elles sont responsables de la régulation de la fonction endocrinienne d'une glande d'importance majeure, la thyroïde. Ce rôle est effectué grâce à la production et la sécrétion de la thyrotropine (TSH) par les cellules thyroïdiques, une hormone qui provoque à son tour la sécrétion de la thyroxine (T4) et la triiodothyronine (T3) par la glande thyroïde. C'est l'hormone de libération de la thyrotrophine (TRH) sécrétée par l'hypothalamus qui stimule la production de la TSH en s'attachant aux récepteurs couplés aux protéines G à la surface des cellules thyroïdiques et en déclenchant une cascade de signalisation impliquant une augmentation du calcium intracellulaire. La TSH ainsi produite est libérée dans la circulation sanguine. Ce sont principalement les hormones thyroïdiennes qui régulent négativement la sécrétion de la TRH (11,14).

### **1.2.1.2 Cellules lactotropes**

La TRH peut également stimuler les cellules lactotropes, qui représentent 15 % des cellules de l'adénohypophyse, à sécréter la prolactine (PRL), une hormone qui induit le développement et la synthèse du lait du tissu mammaire. Toutefois, il a été démontré que la production de la PRL n'est pas entièrement dépendante de la TRH. Des souris déficientes en TRH (TRH<sup>-/-</sup>) peuvent être fertiles et produire du lait, malgré de faibles niveaux de PRL. La PRL est cependant nécessaire pour une fonction optimale des cellules lactotropes et la synthèse de l'ARN messager (ARNm) de la PRL dans l'hypophyse est régulée par la TRH (15,16).

### **1.2.1.3 Cellules corticotropes**

Les corticotropes représentent 5-10 % des cellules de l'adénohypophyse et sont responsables de la sécrétion de l'adrénocorticotropine (ACTH) suite à leur stimulation par l'hormone de libération des corticotrolibérine (CRH) sécrétée par l'hypothalamus. La CRH stimule la transcription de proopiomelanocortine (POMC), un polypeptide précurseur de l'ACTH, ce qui mène à la synthèse et à l'entreposage d'ACTH par les cellules corticotropes. L'ACTH est une hormone qui cible les glandes surrénales principalement pour la production des glucocorticoïdes (cortisol ou corticostérone) mais aussi des minéralocorticoïdes (aldostérone) et

des androgènes (DHEA, androsténédione, testostérone). Comme la synthèse de l'ACTH est principalement régulée par le niveau de cortisol sanguin, l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien est en fait une réponse neuroendocrine au stress (17).

#### **1.2.1.4 Cellules somatotropes**

Les cellules somatotropes constituent 50 % de la population cellulaire de l'adénohypophyse, soit la plus grande population. Ces cellules sécrètent l'hormone de croissance (GH) permettant la prolifération et la différenciation cellulaire au niveau des tissus osseux, musculaires et des organes. La sécrétion de la GH est régulée par l'action antagoniste de deux hormones produites par l'hypothalamus : la somatolibérine (GHRH) et la somatostatine (GHIH), qui est une hormone inhibitrice de l'hormone de croissance. C'est l'équilibre entre la synthèse de la GHRH et la GHIH qui régule la sécrétion de la GH. La GHRH a été isolée pour la première fois à partir de tumeurs pancréatiques causant de l'acromégalie, et plus tard associée à l'hypothalamus. Son récepteur (GHRHR) est majoritairement exprimé par les cellules somatotropes de l'hypophyse (18). Des expériences avec des souris déficientes en GHRHR fonctionnels ou en GHRH ont montré que la prolifération même des cellules somatotropes au sein de l'hypophyse est dépendante de la GH (19). Sans GHRHR fonctionnel ou GNRH, les souris se retrouvent avec une sévère hypoplasie de l'hypophyse (20,21).

#### **1.2.1.5 Cellules gonadotropes**

Les cellules gonadotropes représentent environ 5-15 %, des cellules de l'hypophyse antérieure, bien que cette proportion varie selon les espèces. Plus spécifiquement, chez les souris, on retrouve environ 5-10 % de cellules gonadotropes (22). Comme l'indique leur nom, ce sont les cellules qui sont responsables de la sécrétion des gonadotrophines, soit la FSH et la LH. La FSH et la LH sont des hormones essentielles pour le développement et le maintien de la fonction reproductrice. Les cellules gonadotropes sécrètent les gonadotrophines en réponse à la gonadolibérine (GnRH), une hormone sécrétée par l'hypothalamus selon un mode pulsatile. Plus spécifiquement, la sécrétion de la LH est régulée par la GnRH, tandis que la FSH, bien qu'influencée par la GnRH, peut aussi être sécrétée de manière indépendante. Les gonadotrophines par leur action endocrinienne induisent la sécrétion d'autres hormones (œstrogène, progestérone,



androgènes) par les organes reproducteurs, en particulier les ovaires et les testicules. C'est l'axe-hypothalamo-hypophysio-gonadique (23,24).

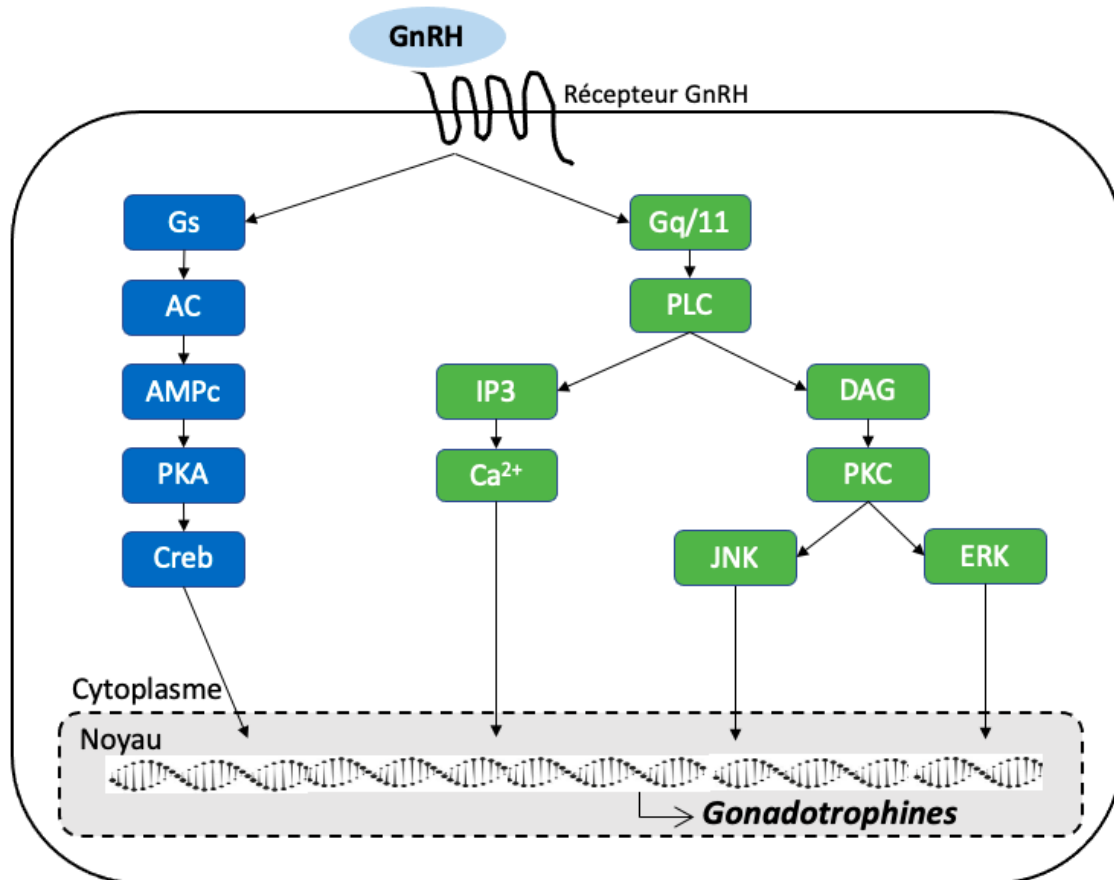
### **1.3 L'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique (HHG)**

L'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique (HHG) est un pilier de la reproduction chez les mammifères. Il s'agit d'un axe endocrinien complexe dont certains mécanismes moléculaires ne sont pas encore élucidés. Par contre, l'utilisation de ciblage génique conditionnel et des lignées cellulaires immortalisées ont permis de mettre en lumière plusieurs voies de signalisation jouant des rôles clés dans l'HHG.

#### **1.3.1 Rôle de l'hypothalamus dans l'axe HHG**

La GnRH est un décapeptide produit par l'hypothalamus qui lui permet de contrôler l'HHG. C'est une hormone dont la structure peptidique est hautement conservée à travers les vertébrés, et on retrouve même un gène semblable chez les invertébrés. (25). Elle a été isolée pour la première fois à partir d'hypothalamus porcine grâce à son action sur la libération de la FSH et la LH (26). Des mesures de la concentration sanguine de la GnRH dans les vaisseaux de la tige de l'hypophyse ont permis de démontrer que la GnRH quitte l'hypothalamus et se rend dans l'adénohypophyse grâce à un système vasculaire porte (27). La GnRH est sécrétée par des neurones de l'hypothalamus et se lie à ses récepteurs transmembranaires à haute affinité (GnRHR) sur les cellules gonadotropes de l'adénohypophyse. Il s'agit de récepteurs pouvant se coupler à différentes protéines G. La voie principale de la GnRH dans les cellules gonadotropes est la voie de la protéine Gq/11, qui active la phospholipase C, ce qui entraîne la formation de diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP3) (Figure 4). Ces complexes déclenchent des voies de signalisation impliquant une augmentation du calcium intracellulaire et les protéines kinases régulées par des signaux extracellulaires (ERK) et les protéines kinases c-Jun N-terminales (JNK) L'étude de ces voies de signalisation dans des cellules gonadotropes immortalisées a permis d'associer la voie de signalisation ERK avec la synthèse de la sous-unité alpha des gonadotrophines (CGA) et la voie JNK avec la synthèse de la sous-unité bêta de la LH. La GnRH peut également activer la protéine Gs, qui phosphoryle l'adénylate cyclase, (AC) ce qui entraîne l'augmentation d'adénosine

monophosphate cyclique (AMPc) et l'activation de la protéine kinase A (PKA). Toutefois, cette dernière voie n'a pas été étudiée dans l'hypophyse, mais plutôt dans des cellules placentaires (28-33).



**Figure 4. La cascade de signalisation de la GnRH.** AC : Adénylate cyclase, AMPc: adénosine monophosphate cyclique, PKA : protéine kinase A, Creb : protéine de liaison de l'élément de réponse à l'AMPc, PLC : phospholipase C, IP3 : inositol triphosphate, DAG: diacylglycérol, PKC : protéine kinase C, JNK : kinase n-terminale de c-Jun, ERK : kinase régulée par le signal extracellulaire (modifié de 31)

La GnRH est sécrétée par près de 1000 neurones dans le système porte de l'hypophyse par des pulsations synchronisées. Ces pulsations se produisent à différentes fréquences, ce qui entraîne la sécrétion différentielle des gonadotrophines. Le pic de LH associé à l'ovulation chez les mammifères correspond à la fréquence de pulsations de GnRH la plus élevée, tandis que lors de la phase lutéale les pulsations sont plus lentes. Plusieurs études ont montré que des pulsations rapides de GnRH induisent la sécrétion de la LH, mais le lien entre les pulsations de GnRH et la sécrétion de la FSH n'a pas encore été complètement élucidé. Il n'est pas clair encore si la FSH est sécrétée

suivant des pulsations lentes de la GnRH ou simplement de manière constitutive, c'est-à-dire indépendamment de l'influence de la GnRH (24,34,35).

### **1.3.2 Rôle de l'hypophyse dans l'axe HHG**

#### **1.3.2.1. Le récepteur de la GnRH**

Il y a trois types de GnRHR identifiés chez les vertébrés (types I, II, III). Cependant, seul le type I semble avoir une activité chez les mammifères (36). Dans l'hypophyse, seules les cellules gonadotropes possèdent des récepteurs pour la GnRH. Toutefois, des récepteurs pouvant se lier à la GnRH ont été identifiés ailleurs dans le système nerveux central. L'hippocampe, les noyaux septaux latéraux et le cortex cingulaire antérieur possèdent des récepteurs pouvant spécifiquement lier la GnRH. Les cellules de l'hypothalamus sécrétrices de la GnRH synthétisent également des GnRHR. De plus, ces récepteurs se retrouvent également au niveau de certains organes reproducteurs. Les cellules de Leydig dans les testicules, les cellules de granulosa et les cellules lutéales dans les ovaires et des cellules placentaires peuvent exprimer des GnRHR (28,37,38).

Chez les souris mâles, les cellules gonadotropes commencent à exprimer des GnRHR au 16<sup>e</sup> jour embryonnaire. En insérant un gène causant la mort cellulaire dans des cellules exprimant des GnRHR par ciblage génique conditionnel, l'importance de la signalisation de GnRH au niveau du développement embryonnaire chez les mâles a été mise en évidence. Deux sous-populations de cellules gonadotropes ont été créées, soit celles sécrétant la LH et celles sécrétant la FSH. Sans les GnRHR, la sécrétion de la LH est compromise, ce qui affecte ensuite le développement des cellules sécrétant la FSH. Cela indique qu'au niveau de l'hypophyse des mâles, les GnRHR sont essentiels pour le développement embryonnaire normal des cellules gonadotropes (39). À notre connaissance, un tel modèle n'a pas encore été testé chez des souris femelles. Il serait intéressant d'investiguer la présence d'un dimorphisme sexuel quant au rôle des GnRHR dans le développement de l'hypophyse, considérant que la régulation de l'axe HHG diffère entre les mâles et les femelles. Cet aspect sera développé dans les sections suivantes. Finalement, chez les souris femelles et les mâles, perturber l'expression des GnRHR entraîne l'interruption du développement des organes sexuels, des concentrations très faibles de la FSH, la LH et la testostérone et l'infertilité (40).

La présence des récepteurs extrahypophysaires et le rôle des GnRHR dans le développement des organes reproducteurs mâles nous obligent à considérer prudemment le ciblage génique conditionnel à partir des GnRHR lors d'études de phénotypes.

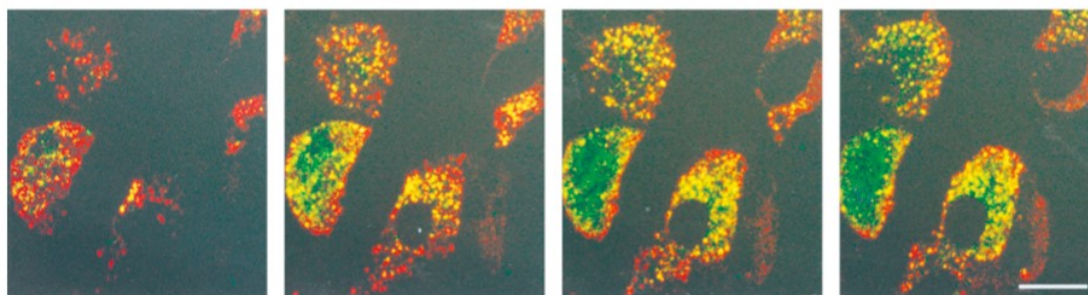
### 1.3.2.2 La sécrétion des gonadotrophines

Comme mentionné précédemment, la sécrétion de la LH est dépendante des pulsations de GnRH. Des pulsations rapides (plus d'une pulsation/par heure) élicitent la sécrétion de la LH par les cellules gonadotropes murines. La FSH semble être sécrétée en réponse à des pulsations lentes de GnRH (moins d'une pulsation par deux ou trois heures) ou alors même de manière constitutive. En effet, en privant l'hypophyse de l'influence de l'hypothalamus, par des moyens génétiques, immunologiques, par culture tissulaire ou par allogreffe, cette glande continue de sécréter la FSH *in vivo et in vitro* (41-44). Ce sont les hormones stéroïdiennes produites par les gonades qui exercent un rétrocontrôle négatif sur la libération de la FSH (45). Toutefois, des stimulations exogènes de GnRH *in vitro* élicitent une augmentation de la FSH et de la LH, suggérant que la sécrétion de la FSH peut effectivement subir l'influence de la GnRH (46).

Malgré les nombreuses études démontrant ces faits, le mécanisme précis au niveau moléculaire qui permet aux cellules gonadotropes de décoder le message pulsatif de l'hypothalamus (GnRH) afin de produire les gonadotrophines de manière différentielle demeure énigmatique. Comme la majorité des cellules gonadotropes de l'hypophyse peuvent sécréter à la fois la LH et la FSH, l'adénohypophyse n'est pas divisée en sous-populations de cellules à capacité endocrine unique. Les cellules doivent donc interpréter le signal en provenance de l'hypothalamus grâce à un mécanisme intracellulaire. À l'instar de la plupart des cellules endocrines, les cellules gonadotropes possèdent des granules sécréteurs qui servent à entreposer et libérer les gonadotrophines. Ces granules contiennent des protéines cargo, des granines, qui sont sécrétées en même temps que les gonadotrophines, soit chromogranine A (CgA), chromogranine B (CgB) et sécrétogranines II (SgII). Alors que la sécrétion de la LH se fait conjointement avec celle de SgII lors de l'exocytose des granules, la FSH semble être entreposée avec CgA, du moins dans l'hypophyse du rat (47). Cependant, il n'y a pas d'évidence de la sécrétion conjointe de la FSH et CgA *in vitro* dans cellules gonadotropes immortalisées (48). Des coupes histologiques d'hypophyses colorées par immunofluorescence montrent que la LH se trouve en périphérie des

cellules près de la membrane cytoplasmique, tandis que la FSH est distribuée uniformément dans le cytoplasme, vraisemblablement entreposée dans un autre type de granules (49,50) (Figure 5). Pour l'instant, il n'est pas encore clair si les granines sont réellement impliquées dans la sécrétion différentielle des gonadotrophines. Cependant, la libération conjointe de la LH et SgII à partir d'un même type de granule suggère que GnRH pourrait réguler la sécrétion de la LH via une voie dépendante des granines. À l'inverse, la sécrétion de la FSH emprunte une autre voie intracellulaire, possiblement indépendante des granules (48). De plus, contrairement à la LH, la FSH ne semble pas être entreposée dans les cellules gonadotropes, mais plutôt sécrétée dès que produite (44).

Il est important de mentionner que chez les souris et les humains, on retrouve une expression de la FSH dite extrahypophysaire, c'est-à-dire qui ne provient pas des cellules gonadotropes. Chez la souris, les ovaires et les testicules peuvent exprimer les sous-unités de la FSH (51,52), tandis que chez les humains, ce sont des tissus tels que l'estomac, la prostate, la veine ombilicale et le myomètre de l'utérus (53-55). Cependant, l'importance physiologique de cette expression n'est pas encore établie. Il n'est pas clair si ces tissus peuvent assembler les sous-unités et réellement sécréter la FSH, ou si les sous-unités ne sont en fait jamais assemblées (56).



**Figure 5. Distribution des granules sécrétrices de la FSH et la LH sur des coupes d'hypophyses antérieures de moutons. LH : rouge, FSH : vert, superposition : jaune (49)**

Mis à part les mécanismes intracellulaires de sécrétion, les gonadotrophines sont régularisées par différents facteurs agissant à la fois de manière autocrine et paracrine qui seront abordés dans les sections suivantes.

## **1.2.4 Les rôles clés des gonadotrophines dans l'axe HHG**

Une fois sécrétées par les cellules gonadotropes, les gonadotrophines, la FSH et la LH, empruntent la circulation sanguine et se dirigent vers les organes reproducteurs. Elles agissent en synergie afin d'assurer le développement et le maintien des fonctions reproductrices des mammifères.

### **1.2.4.1. La FSH**

Chez les mâles, les gonadotrophines servent principalement à promouvoir la spermatogénèse au niveau des testicules en stimulant différents types cellulaires. La FSH cible les cellules de Sertoli, régulant leur développement et leur différenciation. Les cellules de Sertoli sont situées près de la membrane basale des tubules séminifères et jouent un rôle de soutien pour les futurs spermatozoïdes (Figure 6). Des rats déficients en GnRH traités avec la FSH ou exprimant la FSH seulement par recombinaison génétique présentent un nombre plus élevé de cellules germinales, particulièrement les spermatogonies et spermatocytes, que leurs homologues hypogonadiques. Cependant, en l'absence d'androgènes, l'action de la FSH seule ne peut pas générer de spermatozoïdes, le dernier stade de développement des spermatozoïdes (57-59). Cela implique que la participation des androgènes est donc indispensable au développement complet des spermatozoïdes. La FSH agit également de manière indirecte sur la production d'androgène en augmentant le nombre de cellules de Leydig, les cellules situées dans l'interstice entre les tubules séminifères (58). Toutefois, la FSH n'est pas essentielle à la fertilité chez les mâles. Des souris mâles dépourvues de la FSH demeurent fertiles malgré des testicules et un nombre de cellules germinales réduits (60). La FSH contribue également à sa propre régulation. La liaison de la FSH avec son récepteur transmembranaire (FSH-R) à la surface des cellules de Sertoli augmente la sécrétion des inhibines, importantes dans la régulation de l'axe HHG via des mécanismes de rétrocontrôle (61).

Chez les femelles, la FSH contribue au développement folliculaire ovarien en ciblant les cellules de granulosa, les cellules entourant l'ovocyte au centre du follicule (Figure 7). La FSH est indispensable pour le passage du follicule préantral au follicule préovulatoire, mais agit également aux stades folliculaires moins avancés. Inhiber la sécrétion de la FSH par invalidation conditionnelle des gènes empêche les follicules de dépasser le stade préantral durant la

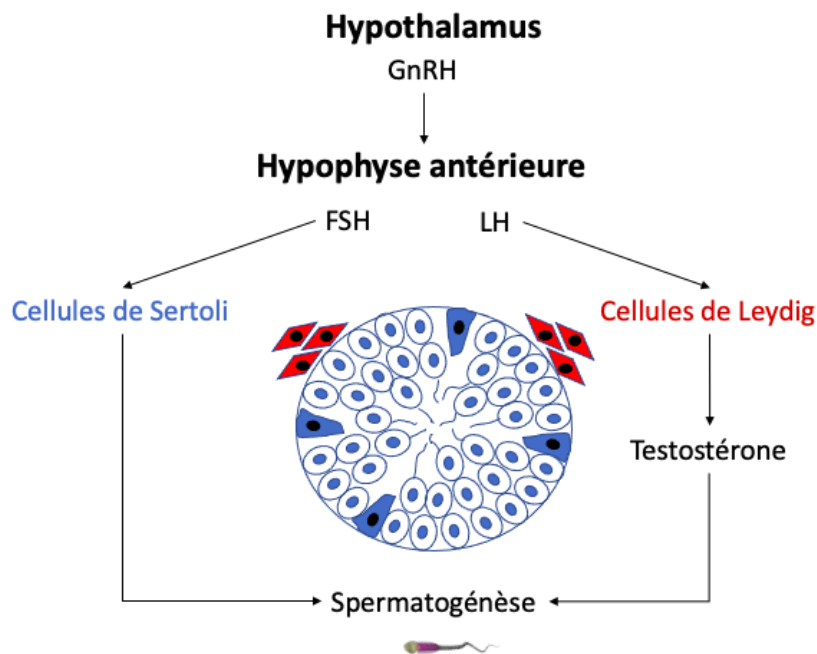
folliculogénèse (62). De plus, traiter des femelles rates pré pubères avec des antagonistes de la GnRH induit une diminution du nombre de follicules préantraux (63), tandis que des traitements de FSH exogènes chez des rattes juvéniles augmentent le nombre de follicules préantraux (64). La fixation de la FSH à son récepteur (FSHR) sur la membrane augmente l'expression de l'aromatase cytochrome P450 (Cyp19a1), qui convertit les androgènes produits par les cellules de la thèque ovarienne en œstrogènes. Les œstrogènes, en contrepartie, amplifient les mécanismes intracellulaires induits par la FSH et ainsi potentialisent son action. Une augmentation de la production d'œstrogènes est indispensable pour une croissance folliculaire normale (65,66). Malgré le rôle significatif de la FSH, la stéroïdogénèse ne peut se faire sans la contribution de la LH. Finalement, le développement de techniques telles que la RT-PCR a récemment permis de mettre en évidence la présence de récepteurs de la FSH dans des tissus extragonadiques. Outre son rôle au niveau de la reproduction, la FSH participe à d'autres processus physiologiques, notamment la déposition de tissu adipeux et la résorption osseuse (67).

#### **1.2.4.2 La LH**

De manière générale, la LH est impliquée dans la production des androgènes. Chez les mâles, les cellules de Leydig, ou les cellules interstitielles des testicules, répondent à la LH en produisant la testostérone (Figure 6), laquelle est indispensable pour permettre aux spermatozoïdes d'atteindre leurs stades finaux de croissance. Les cellules de Sertoli possèdent des récepteurs aux androgènes et donc répondent à la testostérone. En l'absence de testostérone, la spermatogénèse ne peut se compléter, elle s'arrête vers la fin de la méiose (68,69).

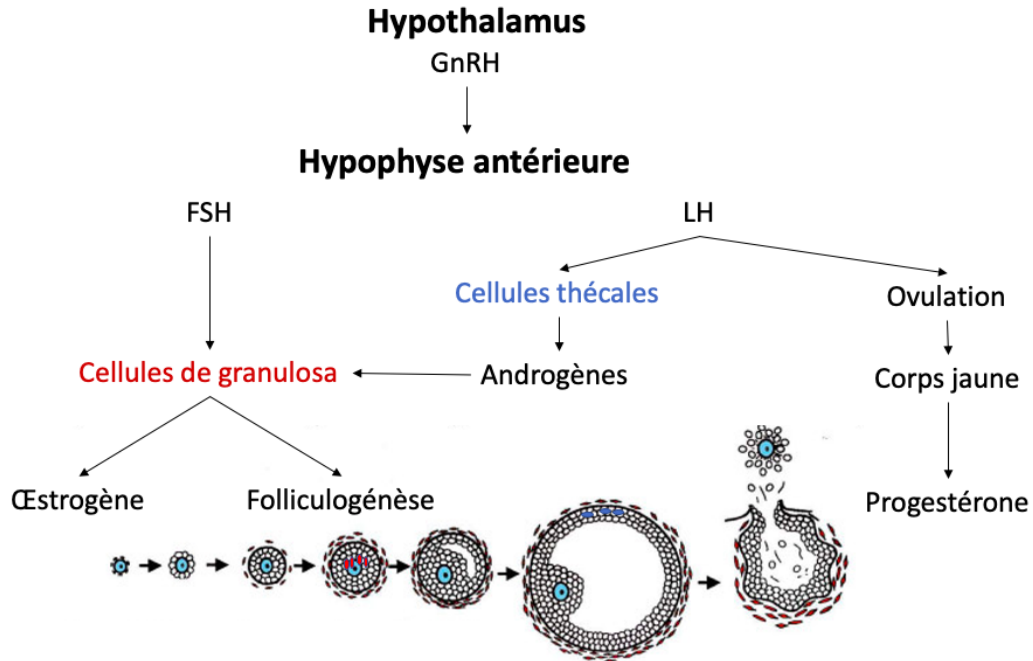
La LH chez les femelles agit de concert avec la FSH pour permettre à un follicule ovarien antral, le follicule dominant, de se démarquer de ses congénères pour devenir le follicule ovulatoire et éventuellement ovuler (70). Cela se fait au travers d'une suite de réactions enzymatiques, la stéroïdogénèse, qui mène à la production de la progestérone et des œstrogènes. D'abord, les cellules thécales, qui bordent les follicules, répondent à la LH en synthétisant la progestérone, l'androsténédione et la testostérone à la suite d'une cascade enzymatique à partir de l'importation du cholestérol. Les androgènes diffusent ensuite vers les cellules de la granulosa et sont convertis en œstrogènes (œstradiol et estrone) sous l'action de la FSH (Figure 7). L'œstradiol et la progestérone agissent de manière paracrine afin de promouvoir le maintien du développement

folliculaire et de la survie des cellules de granuloza. Les androgènes peuvent également stimuler la croissance et le développement folliculaire (71,72). Finalement, le pic de LH qui survient au milieu du cycle œstral induit l'expression de gènes dans les cellules de la granuloza des follicules préovulatoires qui sont critiques pour l'ovulation. Parmi ces gènes, on retrouve le récepteur de la progestérone (PR) et la cyclooxygénase -2 (COX2)(73). Ces gènes déclenchent le processus de l'ovulation, la méiose de l'ovocyte, l'expansion du complexe cumulus-oocyte et la lutéinisation. Suivant l'ovulation, les cellules de granuloza et de la thèque deviennent des cellules lutéales et forment le corps jaune, lequel sécrète la progestérone. Lorsque l'ovocyte est fécondé, le corps jaune est conservé et la progestérone ainsi sécrétée empêche la différenciation finale et ovulation d'un nouveau follicule préovulatoire, assurant ainsi le maintien de la gestation. Lorsqu'il n'y a pas de fécondation, le corps jaune est lysé et l'animal peut de nouveau ovuler (74).



**Figure 6.** Représentation schématique de l'effet des gonadotrophines sur la spermatogénèse (Figure originale).





**Figure 7. Représentation schématique de l'effet des gonadotrophines sur la folliculogénèse et l'ovulation (modifiée de 75)**

## 1.2.5 Rétrocontrôle de l'axe HHG

### 1.2.5.1 Le rétrocontrôle négatif par les hormones stéroïdiennes

Les hormones stéroïdiennes régulées par l'action des gonadotrophines participent non seulement au développement des gonades, mais exercent aussi un rétrocontrôle négatif ou positif sur l'axe HHG (76). Le mécanisme derrière ce rétrocontrôle n'a pas d'action directe et ce n'est que suite à de nombreuses années de recherche que des pistes de solution ont été découvertes. Tout d'abord, les cellules de l'hypothalamus responsables de la sécrétion de la GnRH ne possèdent pas de récepteurs d'hormones stéroïdiennes. Ce sont d'autres cellules au niveau du système nerveux central qui se chargent de relayer le signal des hormones stéroïdiennes vers l'hypothalamus. La découverte du caractère essentiel du ligand kisspeptine et de son récepteur pour la reproduction et les recherches subséquentes ont permis de l'identifier comme un élément majeur de l'intégration du signal stéroïdien. En effet, dans le cerveau murin femelle, 60 % des cellules exprimant kisspeptine expriment aussi le récepteur d'œstrogène (ER) (77,78). Ensuite, la boucle de rétrocontrôle n'est pas tout à fait la même chez les mâles et chez les femelles. Chez les mâles, les hormones stéroïdiennes ont purement un effet de rétrocontrôle négatif. L'administration de

testostérone ou d'œstradiol chez des hommes déficients en GnRH supprime la sécrétion de la LH et la FSH, et la castration d'homme normaux entraîne une augmentation de la sécrétion de la LH. Chez les femelles, la régulation est plus complexe. Alors que la progestérone n'exerce qu'un rôle inhibiteur, les estrogènes exercent soit un rôle inhibiteur ou activateur selon le moment du cycle œstral (41). Finalement, bien que la majeure partie du rétrocontrôle par les hormones stéroïdiennes de l'axe HHG se produise en amont de l'hypophyse, les cellules gonadotropes y participent aussi, mais en moindre mesure, car elles expriment les récepteurs des androgènes et œstrogènes, pouvant ainsi répondre aux hormones stéroïdiennes (79,80).

### **1.2.5.2 Le rétrocontrôle négatif par les inhibines et activines**

Les activines et les inhibines sont des hormones de la famille des TGF $\beta$  sécrétées par les cellules gonadotropes qui agissent de manière autocrine et paracrine sur leur sécrétion endocrinienne. Elles ont été découvertes sur la base de leur capacité à réguler la sécrétion de la FSH, mais pas celle de la LH, dans des cultures d'hypophyses de rats (81). Les activines stimulent la signalisation intracellulaire des gonadotropes afin d'augmenter la sécrétion de la FSH. Les récepteurs des activines (TGF $\beta$ R) se trouvent au niveau de la membrane des cellules gonadotropes. Ils signalent via une cascade de kinases dont les effecteurs finaux sont les SMADs. Les inhibines, structurellement très semblables aux activines, sont produites par les cellules de Sertoli et les cellules de la granulosa ovarienne. Elles exercent une suppression de la synthèse de la FSH en se liant aux récepteurs des activines, bloquant l'action des activines par inhibition de compétition (82).

### **1.2.5.3 Les conséquences d'une mauvaise régulation des gonadotrophines**

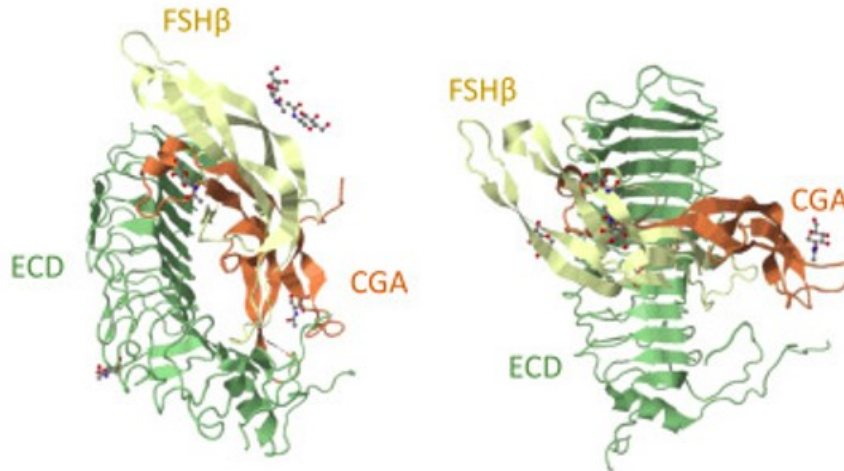
Lorsque l'une ou l'autre de ces hormones est absente ou n'est pas sécrétée normalement, la fonction reproductrice et les organes reproducteurs sont affectés. Des modèles de souris soumis à du ciblage génique ont permis d'établir de manière assez spécifique ce qu'il advient du système reproducteur en l'absence des hormones faisant partie de l'axe HHG. En l'absence de la FSH, des souris mâles demeurent fertiles, mais leurs testicules et le volume des tubules séminifères sont considérablement diminués. Il y a une diminution du nombre de cellules de Sertoli, de cellules germinales et les spermatozoïdes perdent de la motilité (60,83). Contrairement aux mâles, la FSH est essentielle à la fertilité chez les femelles. Sans elle, la folliculogénèse est bloquée en amont du

développement des follicules antraux et l'utérus est sous-développé. Une analyse fonctionnelle du rôle de la LH au niveau du développement a révélé que son absence chez la souris entraîne un défaut du développement postnatal des gonades et une infertilité. Les mâles ont des testicules de taille réduite, peu de cellules de Leydig et une diminution de la testostérone sanguine et intratesticulaire, ce qui se traduit par l'infertilité. Les femelles dépourvues de la LH ont des ovaires plus petits et une diminution des hormones stéroïdiennes circulantes (œstrogène et progestérone). Aussi, alors que la folliculogénèse semble se dérouler normalement aux premiers stades folliculaires, les ovaires sont anormaux à l'histologie, il y a absence de corps jaune et une dégénérescence accrue des follicules antraux, rendant impossible le passage au stade préovulatoire. Les follicules demeurent donc coincés au stade antral, ce qui cause une absence d'ovulation et donc l'infertilité (84,85).

## **2. Régulation de la synthèse des gonadotrophines**

### **2.1 La structure des gonadotrophines**

Les gonadotrophines sont des glycoprotéines dimériques formées de deux sous-unités liées de manière non covalente : la sous-unité alpha, CGA (*Chorionic Gonadotropin  $\alpha$ -subunit*), qui est commune aux deux hormones, et les sous-unités bêta, FSH $\beta$  et LH $\beta$ , qui leur confèrent leur spécificité (Figure 8). CGA, aussi appelée GSU (*Glycoprotein subunit*), est également la sous-unité d'une autre hormone hypophysaire qui occupe un rôle endocrinien très important : la TSH. Les cellules qui la sécrètent, soit les cellules thyrotropes, peuvent donc aussi synthétiser CGA (86-88).



**Figure 8. Représentation structurale de la FSH liée au domaine extracellulaire du récepteur de la FSH (ECD).** Deux différentes orientations sont montrées. La sous-unité FSH $\beta$  est en jaune, la sous-unité CGA est en orange et le domaine extracellulaire du récepteur de la FSH est en vert 88).

## 2.2. La régulation génétique des gonadotrophines

L'étude de la régulation des gènes liés à la synthèse des gonadotrophines est primordiale à notre compréhension des voies de signalisation impliquées. Les gènes considérés comme essentiels dans cette synthèse sont les sous-unités des gonadotrophines, soit *Cga*, *Lhb* et *Fshb*, et également *Gnrhr*, qui initie la signalisation au sein des cellules gonadotropes. Ces gènes sont régulés par divers facteurs.

### 2.2.1 Régulation de *Gnrhr*

Le récepteur de la GnRH joue un rôle primordial au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Son expression génique est soit basale, soit régulée par les hormones stéroïdiennes, l'inhibine, l'activine et par la GnRH elle-même. La GnRH peut à la fois stimuler ou diminuer l'expression de *Gnrhr*. Une stimulation constante de cellules hypophysaires de rat avec de la GnRH durant six heures induit une augmentation progressive de *Gnrhr*, mais au-delà de six heures l'expression de *Gnrhr* diminue (89). Parmi les hormones stéroïdiennes, c'est l'action de l'estradiol qui est la plus caractérisée par rapport à son effet de *Gnrhr*. Elle augmente la réponse à la GnRH ainsi que les ARNm et le nombre de GnRHR dans les cellules gonadotropes de plusieurs espèces de mammifères, comme les moutons, les vaches, les rats et les souris. Contrairement à l'estradiol, la progestérone régule à la baisse à la fois le nombre de GnRHR et la transcription des ARNm de

*Gnrhr*. Ensuite, chez les rongeurs, l'activine augmente la synthèse de GnRHR tandis que l'inhibine produit l'effet inverse (90). Le promoteur de la GnRH est hautement conservé chez les souris et les rats. Plusieurs facteurs de transcription peuvent se lier directement au promoteur et réguler son expression génique. OCT-1 (*Octamer-binding transcription factor-1*) est un facteur qui permet de lier plusieurs éléments fonctionnels dans la région proximale du promoteur. MSX (*muscle segment homeobox*) et DIX2 (*distal-less homeobox 2*) agissent respectivement comme inhibiteur et activateur de l'expression basale et la spécificité cellulaire de GnRH. OTX2 (*orthodenticle homeobox*) augmente l'activité du promoteur, tandis que CREB (*cAMP response element binding protein*) l'inhibe. Finalement, GATA-4, un motif liant de facteurs GATA, interagit avec ses deux facteurs, GBF-A1/A2 et GBF-B1, des facteurs de liaison de boîtes G, afin d'activer le promoteur de GnRH (91).

### 2.2.2 Régulation de *Cga*

La régulation génique de la sous-unité alpha (CGA) a été étudiée non seulement dans les cellules gonadotropes, mais également dans les cellules thyroïdiques. En effet, cette sous-unité est nécessaire à la fois pour la synthèse de la FSH, la LH et la TSH. *Cga* est donc régulée à la fois par la GnRH et par la TRH, et est produite en quantité bien supérieure par rapport aux sous-unités bêta des trois hormones. Les premières voies de signalisation impliquées dans la régulation de *Cga* ont été identifiées dans des cellules trophoblastes du placenta (92,93). Les cellules de l'hypophyse et celles du placenta partagent les voies de signalisation en aval de la réponse induite par la GnRH, notamment la voie de l'AMPc et la voie des ERK (94). Plusieurs séquences sur le promoteur de *Cga* répondant à la GnRH ont été identifiées à l'aide de cultures primaires d'hypophyses de rats (86,94-96). Plusieurs facteurs de transcription se lient au promoteur de *Cga*, tels que les GATA2 (*GATA binding protein 2*), PITX1 (*paired like homeodomain 1*), et des éléments de réponse sur le promoteur de *Cga*, comme CRE (*cAMP response element*),  $\alpha$ ACT (*alpha-activating element*), GSE (*gonadotrope specific element*),  $\alpha$ BE1 (*alpha-basal element 1*), PGBE (*pituitary glycoprotein hormone basal element*) et GnRH-RE (*GnRH response element*) sont impliqués dans sa régulation (97).

### 2.2.3 Régulation de *Lhb*

La régulation de *Lhb* est hautement conservée à travers les espèces et est notamment définie avec plus de certitude que celle de *Fshb*. Trois facteurs de transcription sont impliqués dans la réponse à la GnRH et ils peuvent se lier directement sur la région proximale du promoteur de *Lhb*.

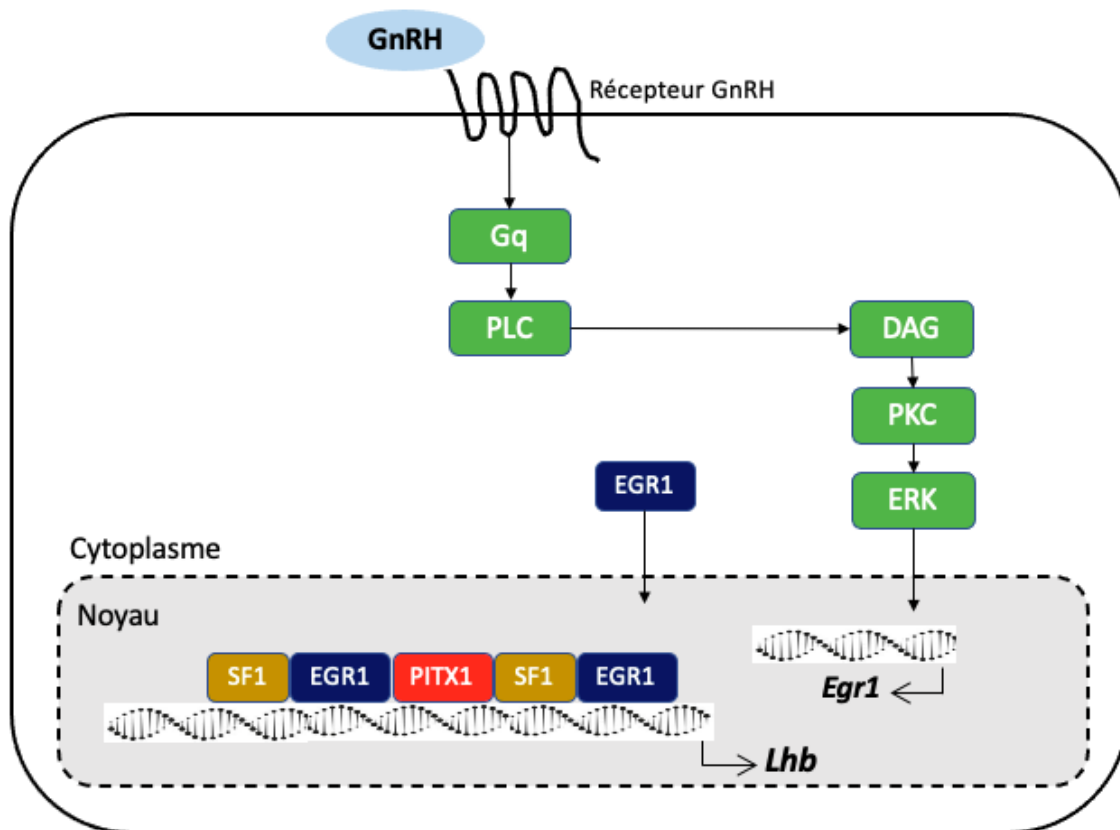
#### 2.2.3.1 Expression de *Lhb* spécifique aux cellules gonadotropes dans l'hypophyse

SF1 (*Steroidogenic factor 1*), aussi appelé NR5A1 (*Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1*), est un récepteur nucléaire et facteur de transcription exprimé dans l'hypophyse seulement par la population de cellules gonadotropes. Il est également exprimé par les gonades et occupe un rôle essentiel dans le développement et la fonction des organes sexuels. SF1 peut à la fois réguler *Lhb* et *Fshb*. Les deux autres facteurs sont PITX1, un facteur de transcription exprimé principalement dans les gonadotropes et EGR1 (*Early Growth Response 1*) (98,99). Bien que le rôle de ces facteurs dans la transcription de *Lhb* soit bien démontré, il existe une certaine redondance fonctionnelle entre eux. En l'absence de EGR1, des souris femelles n'expriment pas LH $\beta$  et sont infertiles, tandis que FSH $\beta$  et CGA ne sont pas affectés. Chez les mâles, l'absence de EGR1 n'affecte pas la fertilité (100). Chez des souris n'exprimant pas SF1, l'expression de CGA et LH $\beta$  est fortement diminuée. Cependant, des traitements avec de la GnRH permettent de rétablir la sécrétion de la LH chez ces souris, suggérant que SF1 est essentiel pour l'expression basale de *Lhb*, mais aussi pour son induction avec GnRH ; ou alternativement, que SF1 est remplacé par une autre protéine lorsque les gonadotropes sont stimulées avec la GnRH (101,102). Finalement, des expériences *in vivo* et *in vitro* démontrent que PITX1 semble nécessaire lors du développement des cellules gonadotropes, mais son absence des cellules gonadotropes matures n'entraîne pas de changement (97,103).

#### 2.2.3.2 Régulation de *Lhb* par GnRH

Le promoteur de *Lhb* est particulièrement sensible aux stimulations par la GnRH. Les régions distales et proximales au promoteur de *Lhb* ainsi que des facteurs de transcription de *Lhb* contiennent des éléments de réponse à la GnRH. La transcription et l'expression de EGR-1 sont stimulées par la GnRH, bien qu'elle n'ait pas d'effet sur PITX1 et SF1(97) (Figure 9). La cascade de signalisation déclenchée par la GnRH qui régule directement LH $\beta$  n'est pas encore complètement élucidée. Plusieurs cascades de protéines kinases activées par des mitogènes

(MAPK) sont impliquées, et constituent un réseau bien complexe. Par contre, le rôle du calcium est bien établi et pourrait être corrélé avec l'activation des isoformes de PKC (104). L'implication de ERK semble bien établie, d'autant plus que ERK est activé après 2-3 minutes de stimulation avec la GnRH (tandis que p38 et JNK s'activent après 30 minutes), permettant d'établir un parallèle avec les pulsations rapides de GnRH induisant la synthèse de LH $\beta$  (105).



**Figure 9. Schématisation simplifiée de la régulation de *Lhb* par la GnRH.** La GnRH se lie à son récepteur sur la membrane des cellules gonadotropes et active la protéine Gq, qui déclenche la voie des ERK. Cette voie active la transcription de EGR1, qui se lie directement sur le promoteur de *Lhb*, aux côtés de SF1 et PITX1. Ensemble, ces facteurs potentialisent la transcription de *Lhb* (modifiée de 106).

### 2.2.3.3 Régulation de *Lhb* par les activines

La régulation de l'expression de *Lhb* par les activines est beaucoup moins investiguée que celle de *Fshb*, notamment car chez l'Humain, le promoteur de *Lhb* ne contient pas de site de liaison aux SMADs, donc à priori n'est pas régulé par les activines. Cependant, de façon intéressante, le promoteur de *Lhb* murin contient 3 sites de liaisons aux SMADs, ce qui ouvre la voie à une régulation par les activines. En effet, une des protéines de la voie des SMADs, SMAD3, est capable

d'interagir avec EGR1 et PITX1, agissant de concert avec la GnRH pour potentialiser l'effet de EGR1 et la liaison entre EGR1 et PITX1 afin activer davantage la transcription de *Lhb* (107).

#### **2.2.3.4 Régulation de *Lhb* par les hormones stéroïdiennes**

Plusieurs études ont pu démontrer, notamment grâce au ciblage génique conditionnel, un rôle de rétrocontrôle des hormones stéroïdiennes dans la sécrétion de la LH. Chez des souris n'exprimant pas le récepteur aux œstrogènes  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ), les niveaux de la FSH ne changent pas, tandis que ceux de la LH restent les mêmes ou augmentent (108,109). D'autres parts, des souris n'exprimant pas le récepteur de la progestérone (PR) dans les cellules gonadotropes n'ont pas de changement au niveau de la sécrétion de la LH, mais l'amplitude du pic de LH est moindre chez les femelles (110). Ces résultats permettent d'avancer l'hypothèse que les hormones stéroïdiennes, du moins les œstrogènes et la progestérone, régulent négativement *Lhb*.

#### **2.2.4 Régulation de *Fshb***

Tout comme les autres gènes impliqués dans la synthèse des gonadotrophines, *Fshb* est régulé principalement par la GnRH. Comme expliqué précédemment, les pulsations lentes de GnRH stimulent la sécrétion de la FSH. Outre la GnRH, l'activine et l'inhibine, des hormones de la famille des TGF $\beta$ , contribuent également à la régulation de la FSH, soit en activant ou en inhibant sa synthèse. Finalement, les hormones stéroïdiennes jouent également un rôle dans cette régulation. La réponse à ces différentes hormones se traduit à l'aide des facteurs de transcription discutés ici.

##### **2.2.4.1 Expression de *Fshb* spécifique aux cellules gonadotropes dans l'hypophyse**

SF1 et PITX1 sont des facteurs impliqués autant dans la transcription de *Lhb* que de *Fshb*. La suppression de SF1 chez des souris, de façon généralisée ou spécifiquement au niveau des cellules gonadotropes, entraîne une diminution marquée de *Fshb* dans l'hypophyse ainsi qu'une diminution de la sécrétion de la FSH. Cependant, comme SF1 régule aussi la transcription de *Gnrhr*, il est possible que la diminution de la FSH soit liée à la diminution de GnRHR. Aussi, l'absence de SF1 n'empêche pas complètement la synthèse de la FSH, indiquant que d'autres facteurs agissent de concert avec SF1 pour contrôler de manière optimale *Fshb*. Ensuite, PITX1 est exprimé dans plusieurs populations de cellules de l'hypophyse et est un régulateur généralisé des gènes transcrit dans l'hypophyse. Lorsque la synthèse de PITX1 et PITX2 est inhibée dans les



cellules L $\beta$ T2, des cellules gonadotropes murines immortalisées, la transcription de *Fshb* diminue. La délétion de PITX1 *in vivo* chez les souris entraîne une diminution de *Fshb*, mais affecte également sévèrement le développement de l'hypophyse. Ce modèle n'est donc pas optimal pour évaluer le rôle de PITX1 spécifiquement au niveau de la transcription des gènes spécifiques des cellules gonadotropes. LHX3 (*LIM Homeobox gene 3*) est exprimé dans les cellules L $\beta$ T2 et a un site de liaison sur le promoteur de *Fshb*. Surexprimer LHX3 dans des cellules gonadotropes humaines et porcines augmente la transcription de *Fshb* (111). Finalement, GATA2 est un autre gène important pour le développement de l'hypophyse, plus spécifiquement dans la différenciation des cellules gonadotropes. Le rôle de GATA2 dans la synthèse de FSH $\beta$  n'est pas absolument défini, mais des cellules gonadotropes matures (L $\beta$ T2) capables de synthétiser FSH $\beta$  expriment davantage GATA2 que leur homologue immature (les cellules  $\alpha$ -T3) incapable de la synthétiser, suggérant un rôle pour GATA2 dans la synthèse de FSH $\beta$  (112).

#### 2.2.4.2 Régulation de *Fshb* par la GnRH

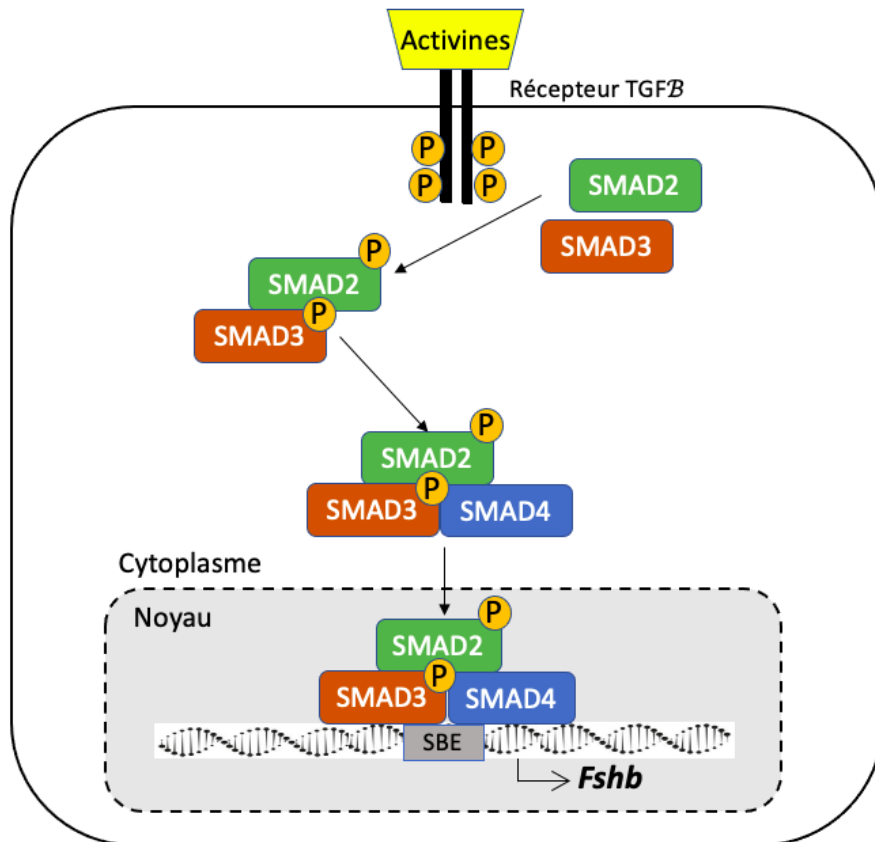
C'est la GnRH qui est la principale régulatrice de la synthèse de FSH $\beta$  pour la majorité des espèces animales, mais les mécanismes précis impliqués ne sont pas encore complètement élucidés. De manière générale, la GnRH déclenche des cascades de protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK), notamment ERK1/2, JNK (voir la section 1.2.1) et p38. Cependant, bien qu'étant activées par la GnRH, le rôle de ces voies dans la synthèse de *Fshb* n'est pas clairement établi. Par exemple, lorsque p38 est inhibé dans des cellules gonadotropes immortalisées (L $\beta$ T2), on observe une diminution de l'induction de *Fshb* par la GnRH. Par contre, stimuler des cellules de l'hypophyse en culture primaire avec un inhibiteur de p38 n'a aucun effet sur l'induction de *Fshb* par la GnRH. Pour ce qui est de JNK, l'inhiber n'affecte pas l'induction de *Fshb* par la GnRH, mais plutôt l'expression basale de FSH $\beta$ . De plus, son activité sur le promoteur de *Fshb* dans les cellules L $\beta$ T2 n'est pas très bien déterminée (113). CREB et Ap-1 sont d'autres facteurs qui semblent influencer sur la réponse à la GnRH. La stimulation avec la GnRH des cellules L $\beta$ T2 provoque la phosphorylation de CREB et le recrutement des protéines de liaison de CREB sur le promoteur de *Fshb*, et ce phénomène correspond temporellement à la production de FSH $\beta$  en réponse à la GnRH *in vivo*, ce qui permet peut-être de corréler les deux événements (114). Pour conclure, les études *in vitro* sur les mécanismes de l'induction de *Fshb* par la GnRH ne

correspondent pas toujours aux résultats *in vivo*, et davantage d'expériences *in vivo* permettraient d'y voir plus clair (112).

#### **2.2.4.3 Régulation de *Fshb* par les activines**

Les activines, tel que décrit plus haut, peuvent stimuler la sécrétion de la FSH ainsi que la synthèse de *Fshb*, ce qu'elles font de manière directe ou indirecte en régulant la synthèse de GnRHR (voir section 2.4.1). Trois activines ont été identifiées, soit A, B et AB. De façon intéressante, les activines sont structurellement très semblables à l'inhibine, mais agissent de manière opposée (115,116). Comme mentionné précédemment, les activines empruntent une voie canonique : la voie des SMADs. De manière générale, les activines se lient à leur récepteur de type sérine/thréonine kinase sur la membrane des cellules gonadotropes, ce qui phosphoryle SMAD2 et SMAD3 qui par la suite s'associe avec SMAD4, ce qui permet la translocation du complexe dans le noyau et l'activation de la transcription de leurs gènes cibles (Figure 10). Les SMAD3 et SMAD4 peuvent se lier directement à l'ADN via l'élément liant de SMAD (SBE) (117). C'est l'activine B qui est sécrétée par les cellules gonadotropes et qui agit de manière autocrine et paracrine. Les recherches *in vitro* avec des cellules L $\beta$ T2 sur le promoteur de *Fshb* de différentes espèces ont montré une potentielle variabilité inter espèce de la sensibilité aux activines. Alors que les promoteurs de *Fshb* ovins, murins et porcins montrent une activité induite par les activines, le promoteur humain ne répond que faiblement (22,118). Une variabilité interespèce semble également se manifester en ce qui a trait au rôle des différentes SMADs dans la régulation de *Fshb*. Chez les rats, l'induction de *Fshb* par les activines semble dépendre de SMAD3 et non de SMAD2 (119), tandis que chez les souris SMAD2 et SMAD3 sont nécessaires (120). Il n'y a pas beaucoup d'études *in vivo* pouvant confirmer les résultats *in vitro*, car la délétion globale de SMAD2 et SMAD4 dans un contexte de ciblage génétique n'est pas compatible avec la vie. La délétion de SMAD3 entraîne une diminution de la fertilité chez les femelles et une diminution de la synthèse de *Fshb* chez les mâles, indiquant que SMAD3 n'est pas essentiel pour la sécrétion de la FSH *in vivo* (22). Un autre facteur exprimé dans les cellules gonadotropes participe à la voie des activines : FOXL2 (*Forkhead box L2*). Cet élément peut se lier avec SMAD3 au niveau du promoteur de *Fshb* afin de participer au complexe SMADs et à la transcription de leurs gènes cibles (121). Bien que FOXL2 ait un site de liaison à haute affinité sur le promoteur *Fshb* porcine, son affinité est faible sur les promoteurs murin et humain. Cependant, supprimer l'expression de FOXL2 à l'aide de

pARNi (petits ARN interférents) dans les cellules L $\beta$ T2 diminue considérablement l'induction de *Fshb* par les activines sur le promoteur murin, conférant un rôle *in vitro* de FOXL2 dans la réponse aux activines (122). Une étude plus récente utilisant l'approche de ciblage génique conditionnel (Cre-Lox) a montré que faire la délétion de *Foxl2* dans les cellules gonadotropes de souris entraîne une diminution de l'expression de *Fshb*, confirmant le rôle de FOXL2 dans la sécrétion de la FSH *in vivo* (123).



**Figure 10. Activation de la cascade des TGF $\beta$  par les activines.** L'activine se lie à son récepteur des TGF $\beta$ , qui phosphoryle SMAD2/SMAD3, qui par la suite peut s'associer avec SMAD4, ce qui permet la translocation du complexe dans le noyau et l'activation de la transcription de leurs gènes cibles (*Fshb* dans les cellules gonadotropes) (Figure originale).

## 3. La voie Hippo

### 3.1 Généralités

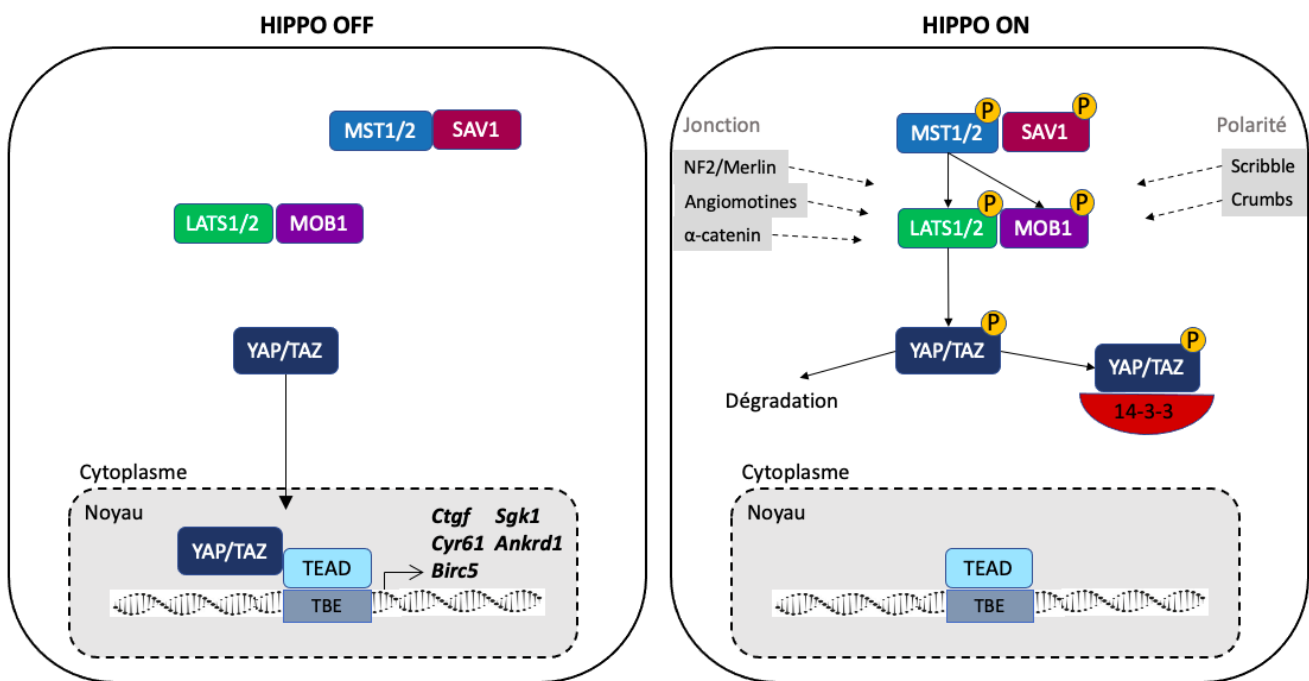
#### 3.1.1 Découverte de la voie de signalisation Hippo

La voie de signalisation Hippo a d'abord été identifiée chez la mouche *Drosophila* en 1995 lorsque des chercheurs ont découvert que l'inactivation d'un gène par le biais de mutations, *Warts* (*wts*), entraînait une croissance exagérée des tissus (124,125). Par la suite, d'autres gènes ont été identifiés comme ayant un rôle similaire : *Salvador* (*sav*), *Mob as tumor suppressor* (*mats*) et *Hippo* (*hpo*). Ces gènes interagissent entre eux par une cascade de kinase et leur inactivation cause une croissance démesurée des tissus. Les organes dont les cellules ont une version mutée de *hpo* deviennent hyperplasique, tel que l'on se figure les organes d'un hippopotame, d'où le gène tient son nom. La voie de signalisation impliquant tous les gènes partageant ce rôle prend également le nom de Hippo. Le dernier gène de la voie, découvert en 2005, *Yorkie* (*yki*), est identifié comme l'effecteur final (126-130). La découverte de cette voie de signalisation représente un intérêt pour la recherche en oncologie qui a permis d'identifier les homologues mammaliens de ces gènes. La plupart des éléments de la voie Hippo de la drosophile sont hautement conservés chez les mammifères. Les *Mammalian sterile 20-like protein kinase 1 and 2* (*Mst1/2*), homologues de *hpo* ; *Salvador family WW domain containing protein 1* (*Sav1*), homologue de *sav* ; *Large tumor suppressor 1 and 2* (*Lats1/2*), homologue de *wts* ; *MOB kinase activator 1A and B* (*Mob1*), homologues of *mats*; et les effecteurs finaux de la voie Hippo *Transcriptional co-activator with PDZ-binding Motif* (*Taz*) et *Yes-associated-protein* (*Yap*), homologues de *yki*, constituent la voie Hippo des mammifères. (131,132).

#### 3.1.2 Cascade de kinases

La voie de signalisation Hippo est une cascade de kinases sérine/thréonines canoniques qui se termine par la phosphorylation de ses effecteurs finaux YAP et TAZ. La voie canonique classique est déclenchée par un signal en amont qui provient d'une source mécanique ou métabolique. Ce signal induit la phosphorylation des MST1/2, qui associées à SAV1 deviennent un complexe protéique enzymatique actif qui phosphoryle les LATS1/2 (133). Elles vont également phosphoryler les MOB1, des protéines qui interagissent avec le domaine auto-inhibiteur

des LATS1/2, ce qui induit une boucle d'activation de phosphorylation des LATS1/2, les rendant pleinement actives (134,135). LATS1/2 exercent ensuite leur propre activité kinase et phosphorylent les effecteurs finaux de la voie, YAP et TAZ. Une fois phosphorylés, YAP et TAZ sont séquestrés dans le cytoplasme et/ou dégradés et n'induisent pas d'activité transcriptionnelle (136). Lorsque la voie Hippo n'est pas activée, les effecteurs ne sont pas phosphorylés et peuvent aller dans le noyau activer la transcription de leurs gènes cibles. (Figure 11). Il existe d'autres voies canoniques moins classiques ne passant par les kinases MST1/2, et agissant directement sur la phosphorylation de LAST1/2, notamment via des protéines G avec les PKA (137,138).



**Figure 11. La cascade de kinases de la voie Hippo inactivée (à gauche) et activée (à droite).** Lorsque la voie est inactive, MST1/2 n'est pas phosphorylé, ce qui empêche le déclenchement de la cascade de kinases, et YAP/TAZ non phosphorylés peuvent aller dans le noyau activer la transcription de leurs gènes cibles. Lorsque la voie Hippo est activée par les signaux en amont, MST1/2 sont phosphorylés, et s'en suivent des phosphorylations successives de LATS1/2 et YAP/TAZ, qui sont séquestrés dans le cytoplasme ou sont dégradés (modifiée de 139)

### 3.1.3 Les effecteurs de la voie Hippo

Les protéines YAP et TAZ sont les coactivatrices transcriptionnelles de la voie Hippo, homologues de la protéine Yki chez la drosophile. Elles jouent normalement un rôle fonctionnellement redondant au sein de la voie Hippo, régulant la transcription des gènes cibles.

### **3.1.3.1 YAP**

YAP est une protéine tyrosine kinase composée de 488 acides aminés et associée à au domaine SH3 de YES. Sa découverte et l'analyse de sa structure dans les années 1990 ont permis de caractériser les domaines WW, des séquences contenant deux tryptophanes conservés (140). YAP est composée de deux domaines WW. Il s'agit de modules structuraux permettant les échanges protéine à protéine grâce à la reconnaissance des sites sérine-thréonines phosphorylés. Ces domaines sont essentiels afin que LATS1/2 puissent reconnaître YAP et phosphoryler ses résidus sérines. YAP possède 6 résidus pouvant être phosphorylés : S61, S109, S127, S164, S381 et S397. Cependant, le résidu S127 a été identifié comme étant le site principal à phosphoryler pour inactiver YAP. En effet, le remplacement individuel de chacune des sérines par une alanine démontre que lorsque S127 est mutée, YAP démontre une plus grande résistance à l'activité kinase de MST/LATS (136,141,142).

### **3.1.3.2 TAZ**

TAZ est une protéine composée d'environ 452 acides aminés qui contient un site de liaison PDZ et un domaine WW pouvant être reconnu et phosphorylé par LATS. Elle a été découverte dans les années 90s comme une molécule pouvant lier les protéines 14-3-3 et dont la structure est homologue à celle de YAP. En effet, les deux cofacteurs possèdent des domaines WW et peuvent lier les mêmes motifs sur les facteurs de transcription (143). TAZ possède 4 résidus sérines pouvant servir de site de phosphorylation, soit S66, S89, S117 et S311(144).

### **3.1.3.3 Rétention cytoplasmique et dégradation**

La phosphorylation de YAP/TAZ par LATS1/2 entraîne leur rétention dans le cytoplasme et inhibe la liaison avec leurs facteurs de transcription. Une fois phosphorylés sur leurs résidus S127 et S89, respectivement, YAP/TAZ se lient aux protéines 14-3-3, dont le rôle est d'ancrer les cofacteurs transcriptionnels dans le cytoplasme et ainsi empêcher leur transport dans le noyau (141). Toutefois, la rétention cytoplasmique n'est pas le seul mécanisme d'inhibition de YAP/TAZ. La phosphorylation d'autres résidus par LATS1/2, soit S381 pour YAP et S311 pour TAZ, entraîne leur dégradation protéosomale par ubiquitination. Plus précisément, la phosphorylation de ces résidus active la kinase caséine 1 (CK1 $\delta/\epsilon$ ), qui phosphoryle un phosphodégrenon (un motif

DSGXXS dans lequel les résidus sérines sont phosphorylés), qui à son tour recrute les  $\beta$ -TRCP1/2 ( *$\beta$ -Transducin repeat-containing proteins*), qui activent les enzymes d'ubiquitination (E1, E2, E3). Ces enzymes attirent le protéasome qui dégrade les protéines ubiquitinées (144,145).

#### **3.1.3.4 Translocation dans le noyau**

Lorsque les résidus de YAP/TAZ ne sont pas phosphorylés, c'est-à-dire lorsque les cellules sont dans un contexte qui inactive la voie Hippo, elles peuvent se transporter dans le noyau et activer la transcription de leurs gènes cibles. Cependant, malgré que YAP/TAZ soient des activateurs transcriptionnels, ils ne peuvent pas lier l'ADN directement. Ils peuvent par contre lier des motifs PPXY (proline/proline/n'importe quel acide aminé/tyrosine) sur des facteurs de transcription à l'intérieur du noyau pour activer la transcription de leurs gènes cibles. Les facteurs de transcription les plus puissamment activés par YAP/TAZ sont les « TEA domain-containing sequence-specific transcription factors » (TEAD). Il y a quatre facteurs reconnus chez les mammifères, TEAD1-4. Le phénotype de souris dont les gènes TEAD1 et TEAD2 sont inactivés dans toutes les cellules ressemble à celui des souris dont le gène YAP est inactivé. Ces souris ont un développement embryonnaire caractérisé par peu de prolifération cellulaire et beaucoup d'apoptose, indiquant que ces facteurs jouent un rôle clé dans la médiation du rôle biologique de YAP (146,147). TEAD est également le partenaire interagissant le plus avec TAZ, et cette interaction est essentielle à l'accumulation de TAZ dans le noyau (148). Les TEADs ne sont toutefois pas les seuls facteurs de transcription pouvant lier YAP/TAZ. Des études effectuées avec des cellules souches embryonnaires ont démontré que YAP/TAZ sont aussi impliqués dans une autre voie, soit celle des BMP, qui signale via les SMADs. L'interaction entre YAP et SMAD1 promeut son activité transcriptionnelle et TAZ est essentiel pour l'accumulation du complexe SMAD2/3-4 dans le noyau et la transcription des gènes cibles de cette voie (149,150). D'autres interactions possibles entre la voie des SMADs et Hippo seront discutées dans la section 4.

#### **3.1.4 Gènes cibles de la voie Hippo**

La combinaison de YAP ou TAZ et TEAD permet la liaison de TEAD à son élément de liaison à l'ADN (TBE) et la transcription des gènes cibles de la voie Hippo. Des études génomiques ont permis d'identifier plusieurs de ces gènes, généralement considérés comme des oncogènes. Entre autres, les gènes les plus connus sont *Ctgf* (*Connective tissue growth factor*) et *Cyr61*

(*Cysteine-rich, angiogenic inducer 61*), des gènes qui stimulent la prolifération cellulaire ; *Ankrd1* (*Ankyrin repeat domain 1*) est un facteur de transcription, *Birc5* (*Baculoviral IAP repeat containing 5*) est un inhibiteur de l'apoptose et *Sgk1* (*Serum/glucocorticoid regulated kinase 1*) une protéine kinase (Figure 11) (151,152).

### 3.1.5 Signaux en amont

La voie Hippo n'est pas activée par une famille de ligands à l'instar de la plupart des voies de signalisation. Elle ne possède pas de ligand spécifique, mais est plutôt régulée par de nombreux facteurs provenant de l'environnement, du métabolisme et même d'autres voies de signalisation.

#### 3.1.5.1 Contacts, jonctions et matrice cellulaire

Une partie importante de la régulation de la voie Hippo provient des contacts et de l'adhésion entre les cellules. Elle dépend d'un concept classique de l'architecture de l'épithélium : l'inhibition de la prolifération par contact cellulaire. Une haute densité de cellules en culture induit la phosphorylation de YAP/TAZ et sa relocalisation au cytoplasme, tandis qu'avec une faible densité de cellules YAP/TAZ se trouvent dans le noyau. De plus, l'augmentation des jonctions intercellulaires des cellules en confluence élevée cause l'activation des kinases LATS1/2 et donc l'inactivation de YAP/TAZ (141). Un complexe protéique situé près des jonctions intercellulaires, NF2/Merlin, joue un rôle important dans l'inhibition de YAP/TAZ par différents moyens, entre autres en assemblant des protéines d'échafaudages, Kibra, qui permettent l'activation de LATS1/2 et la phosphorylation de YAP/TAZ. D'autres protéines d'adhésion, comme les angiomotines (AMOT), la « protein tyrosine phosphatase non-receptor type 14 » (PTPN4) et  $\alpha$ -catenin, partagent le même rôle (Figure 11) (153-155). La voie Hippo est également influencée par la rigidité de la matrice extracellulaire. Lorsque la matrice est rigide, YAP n'est pas phosphorylé et peut aller dans le noyau activer ses gènes cibles, tandis que lorsque la matrice est souple, YAP est phosphorylé (152). Certaines de ces protéines répondent aux stimuli mécaniques pouvant réguler la voie Hippo en modifiant la conformation du cytosquelette d'actine (154,156). En résumé, l'adhésion cellulaire, la formation de jonction intercellulaire et la nature de la matrice extracellulaire peuvent réprimer l'activité transcriptionnelle de YAP/TAZ, donc activer la voie Hippo.



### 3.1.5.2 Les protéines de polarité cellulaire

Des protéines de polarité cellulaire, telles que Scribble (SCRIB) et Crumbs (CRB), les angiomotines (AMOT) (impliquées aussi dans les jonctions) (Figure 11) interagissent avec des éléments de la voie Hippo comme MST1/2 et LATS1/2 (132,155,157,158). Ces protéines agissent principalement en inactivant YAP par la phosphorylation ou la séquestration de YAP dans le cytoplasme grâce au cytosquelette d'actine. Ces protéines exercent donc leur fonction en amont et en aval de la voie Hippo, selon le mécanisme utilisé. Cependant, il est possible que le lien entre la polarité cellulaire et la voie Hippo soit indirect et que certaines d'entre elles régulent la polarité cellulaire et la voie Hippo par le biais de différents mécanismes (159).

### 3.1.5.3 Les facteurs solubles et récepteurs couplés aux protéines G

Certains récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) peuvent activer ou inhiber la voie Hippo. Des hormones mitogènes et facteurs de croissance peuvent lier ces récepteurs pour induire la prolifération cellulaire. L'acide lysophosphatidique (LPA), la thrombine, l'angiotensine II et les œstrogènes peuvent activer YAP/TAZ (138), alors que d'autres ligands comme l'épinéphrine et le glucagon, peuvent inhiber YAP/TAZ. L'angiotensine II est un ligand qui peut à la fois activer et inhiber YAP/TAZ selon le type cellulaire. L'action du ligand dépend du type de protéines G couplées à son récepteur. Les RCPG signalent par le biais de Rho-GTPases qui peuvent inhiber les LATS1/2. Les RCPG couplés à  $G\alpha_{12/13}$  activent directement les Rho-GTPases, tandis que  $G\alpha_{q/11}$  et  $G\alpha_s$  passent par une protéine kinase C et A, respectivement, pour activer la Rho-GTPase.  $G\alpha_{q/11}$  peut à la fois activer ou inhiber les Rho-GTPases et  $G\alpha_s$  inhibe les Rho-GTPases (132,138).

### 3.1.5.4 Le rôle du métabolisme cellulaire

Finalement, la voie Hippo peut également être régulée par un signal d'ordre métabolique. Comme YAP/TAZ sont des facteurs de transcriptions qui induisent la prolifération et la croissance cellulaire, ils sont dépendants de l'énergie et de l'apport nutritionnel des cellules. Un déficit d'apport énergétique tel une privation de glucose peut entraîner la phosphorylation de YAP/TAZ et donc leur inactivation, ce qui permet de préserver l'énergie utilisée abondamment en situation d'anabolisme. D'autre part, en condition d'hypoxie, LATS2 est ubiquitiné et dégradé par le protéasome et la transcription de TAZ est augmentée, ce qui potentialise l'activation de YAP/TAZ. L'hypoxie est donc un déclencheur de la prolifération cellulaire, ce qui confirme le rôle du manque

d'oxygène dans des processus pathologiques tels que le cancer (132,137). Les acides gras sont des éléments essentiels lors de prolifération cellulaire, car ils composent la membrane des cellules. L'inhibition d'une enzyme responsable de la synthèse d'acides gras monosaturés (*Stearoyl-CoA-Desaturase 1*) entraîne la désactivation de YAP/TAZ. Par conséquent, la synthèse *de novo* d'acides gras monosaturés est liée à la transformation oncogène des cellules (137).

## **3.2 Fonction chez les mammifères**

### **3.2.1 Développement**

Le rôle de la voie Hippo chez les mammifères est principalement de contrôler le développement des organes ainsi que l'homéostasie des tissus en modulant la prolifération cellulaire, l'apoptose et la différenciation cellulaire. Au cours du développement embryonnaire, la voie Hippo sert à coordonner la transition de la prolifération cellulaire à la quiescence en plus d'assurer une différenciation cellulaire adéquate. En effet, la surexpression de YAP dans les intestins de la souris cause une expansion des cellules progénitrices et une perte des cellules différenciées (160). Aussi, la perte de SAV1 chez la souris entraîne une hyperplasie des cellules progénitrices et une perte de la différenciation de plusieurs tissus tels que la peau, les intestins et l'épithélium pulmonaire (161). Cette même surexpression de YAP dans le foie permet une prolifération différenciée des hépatocytes, mais pas de perte de différenciation, ce qui indique que Hippo n'est pas toujours impliquée dans la différenciation cellulaire (160). En résumé, les effecteurs YAP/TAZ non phosphorylés localisés dans le noyau sont associés à une activité kinase diminuée donc une promotion de la croissance, une inhibition de l'apoptose et l'état de cellule souche. À l'inverse, lorsque YAP/TAZ sont cytoplasmiques et phosphorylés, ils sont associés avec une activité kinase accrue et une restriction de la croissance cellulaire. Le rôle de la voie Hippo dans le contrôle de la prolifération cellulaire l'a mise en avant-plan dans la recherche sur la compréhension des mécanismes moléculaire supportant les processus tumoraux (162).

### **3.2.2 Tumeurs**

La voie Hippo a d'abord été définie chez la Drosophile grâce à des techniques de criblage génétique afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la suppression des tumeurs (125). Depuis, des études sur la tumorigenèse dans différents tissus ont permis d'établir le rôle de

suppression des tumeurs de la voie Hippo. Des mutations dans les éléments de la voie Hippo mènent souvent à des cancers. Par exemple, l'activation prolongée de YAP dans le foie, l'œsophage et le cerveau induisent des carcinomes hépatocellulaires, des carcinomes spinocellulaires et des médulloblastomes (163-165). Des mutations de NF2 sont régulièrement observées dans les mésothéliomes malins, schwannomes et méningiomes (166). Des souris déficientes en LATS1 développent des sarcomes des tissus mous et des tumeurs ovariennes (167). L'expression augmentée de YAP/TAZ ou leur abondance dans le noyau sont observées dans différents types de cancers, incluant les seins, les poumons, le colon, les ovaires et d'autres tissus (132).

### 3.3 La voie Hippo dans l'hypophyse

Le lien entre la voie Hippo et l'hypophyse a été établi tout récemment. Nous disposons donc de peu de données présentant une corrélation entre Hippo et l'hypophyse. D'abord, une étude a montré que l'hypophyse des souris n'exprimant pas LATS1 est hyperplasiée et peuplée des cellules morphologiquement anormales, ce qui affecte la fonction endocrinienne. En effet, la production de la LH et de la PRL est diminuée, tandis que celle de la FSH n'est pas affectée. Ces changements hormonaux empêchent les souris femelles de cycler et donc elles sont infertiles (167). Ensuite, l'expression des éléments de la voie Hippo, tels que les gènes *Fat3*, *Fat4*, *Mst1*, *Mst2*, *Lats1*, *Yap* et *Tead2* et les protéines YAP et TAZ a été détectée dans l'hypophyse murine en développement. Grâce à l'hybridation *in situ* et l'immunofluorescence, un groupe de chercheurs a pu mettre en évidence la présence de ces gènes et protéines dans plusieurs stades de développement embryonnaires. *Mst1*, *Mst2* et *Lats1* sont fortement exprimés durant tout le développement, tandis que *Lats2* est à peine transcrit, permettant d'émettre l'hypothèse que LATS1 est la kinase principale en amont de YAP/TAZ dans l'hypophyse. Pour ce qui est des *Teads*, c'est *Tead2* qui est le plus exprimé donc probablement le facteur le plus important en amont de la voie. Les localisations cytoplasmiques et nucléaires appropriées des protéines YAP/TAZ phosphorylées ou non phosphorylées suggèrent un rôle fonctionnel de la voie Hippo dans l'hypophyse murine (168). Le même groupe a montré que l'activation de la voie Hippo durant le développement est essentiel à la régulation de la taille de l'hypophyse et à la différenciation des cellules souches vers les différentes lignées cellulaires. La délétion post-natale de *Lats1* (donc une activité augmentée de YAP/TAZ) cause une multiplication incontrôlée des cellules souches hypophysaires non différenciées, donnant naissance à des tumeurs hypophysaires agressives qui ne sécrètent pas d'hormone. Curieusement,

la surexpression seule de YAP activée (sans TAZ) dans l'hypophyse post-natale n'induit pas de tumeurs et n'empêche pas la différenciation des cellules souches (169).

Ensuite, le groupe s'est intéressé au patron d'expression de la voie Hippo dans des hypophyses humaines normales et tumorales. Ils ont démontré la présence de YAP/TAZ non seulement dans l'hypophyse embryonnaire, mais aussi dans l'hypophyse adulte. Aussi, les cofacteurs sont fortement exprimés dans des tumeurs hypophysaires non différenciées. Finalement, ils ont découvert que l'inhibition de *Lats1* dans des cellules lactosomatotropes immortalisées entraîne une diminution de l'activité des promoteurs de *Gh* et *Prl*, permettant d'envisager la possibilité d'un rôle suppressif de la voie Hippo dans la sécrétion hormonale de l'hypophyse (170).

#### **4. Interactions possibles de la voie Hippo dans l'hypophyse**

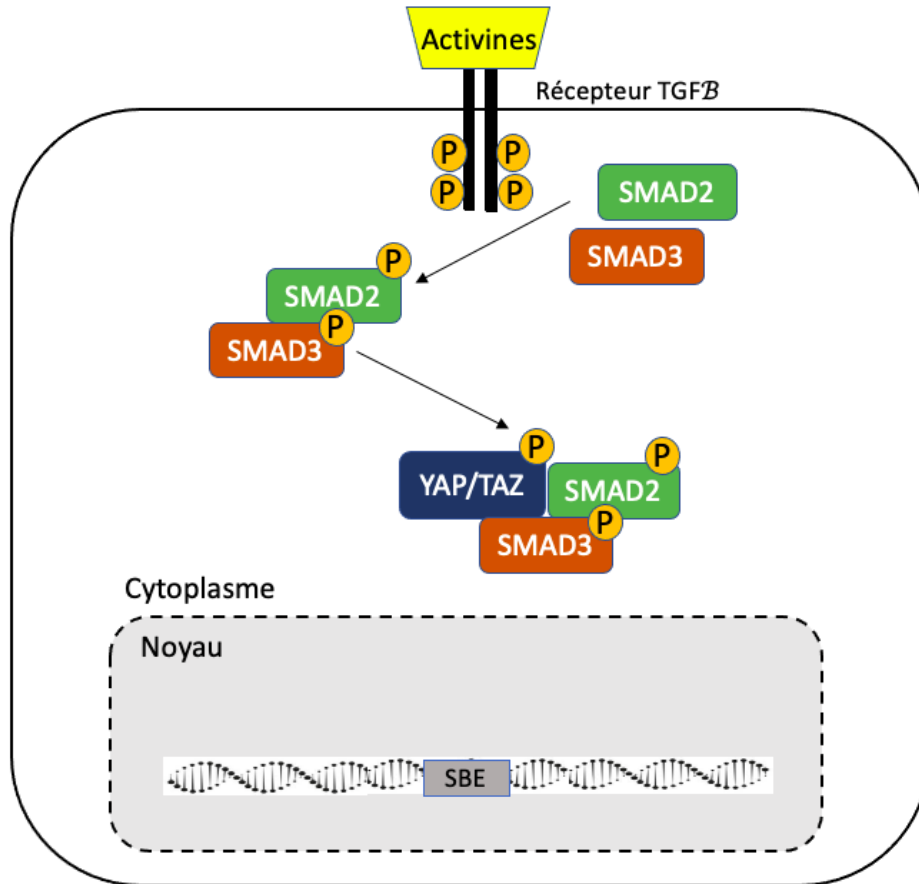
Malgré la récente démonstration de la présence d'éléments de la voie Hippo dans l'hypophyse, son rôle fonctionnel dans la sécrétion endocrinienne n'a pas encore été complètement élucidé. Les régulateurs de la synthèse des gonadotrophines qui peuvent interagir avec des éléments de la voie Hippo nous permettent d'établir des hypothèses quant au rôle endocrinien de cette voie dans l'hypophyse. Les SMADs jouent un rôle dans l'induction de *Fshb* par les activines. Interagissent-elles aussi avec la voie Hippo afin de réguler l'expression des gonadotrophines ? Aussi, la voie des Wnts, impliquée lors du développement de l'hypophyse, peut interagir avec les effecteurs de la voie Hippo.

#### **4.1 Hippo et TGF $\beta$**

##### **4.1.1 YAP-TAZ et SMAD2/3-4**

Plusieurs interactions entre la voie Hippo et les SMADs ont été mises en évidence dans différents types cellulaires et modèles. Tout d'abord, l'existence d'une interaction entre TAZ et SMAD1/2/3/4 induite par une stimulation de TGF $\beta$  a été démontrée dans des cellules souches embryonnaires. Ensuite, l'utilisation de pARNi a permis d'inactiver l'expression de TAZ dans les cellules stimulées aux TGF $\beta$ . Les cellules exprimant toujours TAZ avaient une grande quantité de SMAD2 dans le noyau, tandis que dans les cellules traitées avec les pARNi, TAZ était plutôt

distribué partout. En l'absence de TAZ, le complexe SMAD2/3-4 ne réussit pas à s'accumuler dans le noyau pour activer la transcription de ses gènes cibles. TAZ peut donc réguler l'accumulation nucléaire des SMADs lorsque la voie TGF $\beta$  est activée (149). Ensuite, il a été démontré qu'interférer avec la phosphorylation de YAP/TAZ entraîne leur accumulation dans le noyau avec SMAD2/3. Autrement dit, l'inactivation de la voie Hippo permet la transcription des gènes cibles des SMADs (157). Finalement, une autre étude a permis de mettre en évidence l'interaction entre les voies Hippo et TGF $\beta$ . En effet, en stimulant des cellules kératinocytes immortalisées avec TGF $\beta$ , on induit la formation de complexes YAP/TAZ-SMAD2/3. De plus, ces complexes se retrouvent principalement dans le noyau en conditions de faible densité cellulaire, et principalement dans le cytoplasme lorsque la densité est haute (171). Ces résultats montrent que la voie Hippo, ou du moins des effecteurs YAP et TAZ, ont un certain contrôle sur la localisation des complexes SMADs activés, qui dépend de la densité cellulaire. Ils peuvent en effet séquestrer le complexe SMAD2/3 dans le cytoplasme en condition de densité cellulaire élevée. En résumé, certaines études montrent que l'activation des effecteurs YAP/TAZ induit la séquestration du complexe SMAD2/3 activé, tandis que l'inactivation de la voie Hippo permet la translocation du complexe SMAD2/3 activé dans le noyau et la transcription des gènes cibles de cette voie (Figure 12).



**Figure 12. Séquestration du complexe SMAD2/3 dans le cytoplasme par YAP/TAZ.** YAP/TAZ phosphorylé par la cascade de kinase de la voie Hippo peut lier le complexe SMAD2/3 phosphorylé et ainsi le séquestrer dans le cytoplasme, l'empêchant de venir activer la transcription de ses gènes cibles (Figure originale).

#### 4.1.2 YAP et SMAD7

SMAD7 est responsable de la régulation négative de la voie TGFβ/SMAD activée. Une fois que SMAD7 est lié au récepteur de TGFβ, il sera ubiquitiné, internalisé par endocytose et détruit au protéasome. SMAD7 peut lier YAP par son domaine WW, entraînant sa séquestration au cytoplasme. De façon intéressante, la présence de YAP potentialise l'effet inhibiteur de SMAD7. *In vitro*, la transcription induite par les TGFβ est réduite lorsque les cellules sont traitées avec SMAD7, et davantage réduite si on ajoute YAP, selon un effet additif. YAP semble donc dans ce contexte jouer un rôle d'inhibition dans la signalisation TGFβ/SMAD (172,173).

## 4.2 Hippo et Wnts

La voie des Wnts, impliquée dans le développement de l'hypophyse (voir section 1.1) peut aussi avoir des interactions avec la voie Hippo. DVL (*Dishevelled*) est une protéine d'échafaudage partagées par les voies canonique et non canonique des Wnts qui participe à la régulation de l'activité de  $\beta$ -Caténine. DVL peut interagir avec la voie Hippo : elle est responsable de l'exportation de YAP phosphorylé du noyau vers le cytoplasme et est également impliquée dans le déplacement intracellulaire de YAP (174). De plus, YAP et TAZ peuvent servir d'effecteurs en amont d'une voie alternative des Wnts (par opposition aux voies canoniques et non- canonique des Wnts). Cette voie, indépendante de  $\beta$ -Caténine, peut induire l'activité de YAP-TAZ et TEAD (175).

## **Chapitre 2. Hypothèse et objectif**

Notre hypothèse initiale pour ce projet était que la voie Hippo, par le biais de ses co-activateurs transcriptionnels YAP et TAZ, participe à la régulation de la synthèse des gonadotrophines dans les cellules gonadotropes de l'hypophyse en interagissant avec la voie des SMADs. L'objectif de la présente étude fut donc de déterminer le rôle physiologique de YAP et TAZ dans la synthèse de la FSH et la LH à l'aide de ciblage génique conditionnel, de cultures primaires de cellules hypophysaires et de lignées cellulaires gonadotropes immortalisées



## Chapitre 3. Article en tant que première auteure

### YAP and TAZ regulate LH release by pituitary gonadotrope cells in mice

Ariane Lalonde-Larue<sup>1</sup>, Alexandre Boyer<sup>1</sup>, Esdras Corrêa Dos Santos<sup>1</sup>, Xiang Zhou<sup>2</sup>, Derek Boerboom<sup>1</sup>, Daniel J. Bernard<sup>2</sup>, Gustavo Zamberlam<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Centre de recherche en reproduction et fertilité (CRRF), Faculté de médecine Vétérinaire, Université de Montréal

<sup>2</sup>Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University

*\*Correspondence:*

Gustavo Zamberlam, Centre de Recherche en Reproduction et Fertilité, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, QC, J2S 7C6, Canada.

Phone: 1-450-773-8521 ex 0196, e-mail: [gustavo.zamberlam@umontreal.ca](mailto:gustavo.zamberlam@umontreal.ca)

This manuscript is in the final phase of preparation to be submitted to *Endocrinology*.

## Abstract

Hippo is an evolutionarily highly conserved signaling pathway with critical roles in cell differentiation, proliferation and apoptosis in a variety of tissues. Although recent reports demonstrated activity of the Hippo kinase cascade in mouse anterior pituitary gland, whether the Hippo pathway is involved in regulating gonadotropins production remains completely unknown. The objective of this study was therefore to characterize the roles of the Hippo transcriptional coactivators YAP and TAZ to gonadotropins synthesis and secretion. Using a conditional gene targeting approach (cKO), we found that gonadotrope-specific inactivation of *Yap* and *Taz* resulted in increased circulating levels of FSH and LH in adult male mice, along with a slight sperm density increase. cKO female mice had augmented circulating LH (but not FSH) levels, which were associated with a hyperfertility phenotype characterized by higher ovulation rates and larger litter sizes. Surprisingly, the loss of YAP/TAZ in gonadotropes did not appear to affect key gonadotropin synthesis-related genes, but both basal and GnRH-induced LH secretion was increased in pituitary cells from cKO mice cultured *in vitro*. In addition, pharmacological inhibition of YAP/TAZ binding to TEAD family of transcription factors affected both basal and GnRH-induced LH secretion in L $\beta$ T2 gonadotrope-like cells *in vitro*. Taken together, these results suggest that YAP/TAZ, and by extension Hippo signaling, exert a suppressive role on gonadotropin secretion (particularly LH) in gonadotrope cells.

**Key words:** YAP, TAZ, gonadotropins, KO mice, fertility

## Introduction

The gonadotrope cells in the anterior pituitary gland are responsible for the production of the gonadotropins follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH), two critical regulators of gonadal function in mammals (1-4). In males, while FSH supports normal spermatogenesis via its action in testicular Sertoli cells, LH stimulates androgen production by Leydig cells (2,3). In females, FSH is critical for ovarian follicle growth and maturation (4,5) and LH regulates steroidogenesis by the ovaries and is critical for ovulation and luteinization (5,6). Therefore, deregulation in the production of one or both gonadotropins can affect fertility in both sexes.

LH and FSH are dimeric glycoproteins composed of a common alpha subunit (CGA) and unique  $\beta$  subunits (LH $\beta$  and FSH $\beta$ ) which confer biological specificity (1,2). The rate-limiting step in gonadotropin synthesis is however the expression of *Lhb* and *Fshb*. The main regulator of *Lhb* transcription is the gonadotropin releasing hormone (GnRH) (7). Briefly, GnRH binds to its receptor (GnRHR) to induce early-growth response 1 (EGR1) via extracellular regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) (8,9). EGR1 in turn will act in concert with NR5A1 (also known as steroidogenic factor 1; SF1) and paired-like homeodomain transcription factor (PITX) proteins within the *Lhb* promoter to activate its transcription (10-13). On the other hand, *Fshb* transcription is mainly regulated by transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily ligands such as activins (14). Once they bound to their receptors, activins stimulate the phosphorylation of intracellular SMAD proteins 2 and 3 (mainly SMAD3), which complex with SMAD4 and accumulate in the nucleus. Then, the SMAD2/3/4 complex act as transcription factors in combination with forkhead box L2 (FOXL2) to promote *Fshb* transcription (1,15,16). Although it has been demonstrated that *Lhb* expression is independent of activins action (2,17), it is also reported that SMAD proteins are a part of a transcriptionally active complex that is critical for the regulation of the *Lhb* gene transcription (18).

A pathway that has been shown to interact with SMADs in several tissues other than pituitary gland is the Hippo pathway (19). Hippo is an evolutionarily highly conserved signaling pathway composed by a core kinase cascade that ultimately results in the phosphorylation of the transcriptional co-regulatory proteins Yes-associated protein (YAP) and transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ) (20). In the absence of Hippo signaling activity, unphosphorylated YAP/TAZ accumulate in the nucleus and form complexes with numerous transcription factors,

notably those of the TEAD family, resulting in the modulation of the transcriptional activity of target genes in a cell type- and context-specific manner (21,22). When Hippo signaling is active, YAP/TAZ are exported to the nucleus. While phosphorylation of YAP/TAZ by casein kinase 1 results in their ubiquitination by  $\beta$ -TrCP and subsequent proteasomal degradation (23,24), phosphorylated YAP/TAZ can also bind proteins of the 14–3-3 family, resulting in their retention in the cytoplasm (25). In this context, studies have established functional interactions between Hippo and the TGF $\beta$ /activin/nodal branch of receptor-regulated SMADs. In epithelial cells, high cell density induces YAP/TAZ phosphorylation and cytoplasmic retention, which in turn bind to TGF $\beta$ -induced SMAD2/3/4 complexes and sequester them in the cytoplasm, thereby suppressing TGF $\beta$  signaling (19). Another study reported that YAP can bind an inhibitory Smad (SMAD7) and promote its role in preventing the phosphorylation of SMAD2/3 (26). Taken together, these findings led us to hypothesize that YAP and/or TAZ could play an important role in the transcriptional regulation of gonadotropins synthesis-related genes, particularly *Fshb*.

Recently, the expression of YAP and TAZ during embryonic and postnatal development of the pituitary gland has been described in mice (27). It was demonstrated nucleocytoplasmic expression of YAP and TAZ in scattered cells throughout the anterior lobe of postnatal pituitaries. Although the authors suggest a possible role for this pathway in the regulation of the uncommitted stem/progenitor cell pool (especially during embryogenesis), this function remains to be elucidated. Most importantly, the physiological roles of the Hippo effectors YAP and TAZ in gonadotrope cells remain completely unknown. For this reason, the objective of the present study was to determine the physiological relevance of the Hippo effectors YAP and TAZ to gonadotropin production in mice gonadotropes. For this, we employed an *in vivo* conditional gene target approach and made use of the immortalized gonadotrope cell line LBT2.

## **Materials and methods**

### **Ethics**

All animal procedures were approved by the Comité d'éthique de l'utilisation des animaux (CÉUA) de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal and conformed to the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals.

## Animal models and genotyping

C57BL/6J wild-type mice (referred to herein as wild-type) were purchased from The Jackson Laboratory. Mice bearing floxed alleles for *Yap* and/or *Taz* described in (28,29) and referred to herein as *Yap*<sup>flox/flox</sup>;*Taz*<sup>flox/flox</sup>, were graciously provided by Eric Olson (University of Texas Southwestern Medical Center). These mice were mated to mice bearing a GnRH receptor-IRES-Cre driver (acquired from Dr. Daniel Bernard, McGill University, Montreal, Canada), referred to herein as *Gnrhr*<sup>Gric/+</sup>, to obtain the conditional knockout mice (referred to herein as *Yap*<sup>flox/flox</sup>;*Taz*<sup>flox/flox</sup>;*Gnrhr*<sup>Gric/+</sup> or cKO mice) and their littermates which were used as controls (referred to herein as *Yap*<sup>flox/flox</sup>;*Taz*<sup>flox/flox</sup> or control mice). The *GnRHR*<sup>Gric/+</sup> gene was always introduced by the females because of the role of the GnRHR in the male reproductive germline (30). All mice were genotyped by PCR with DNA extracted from tail biopsy. Genotyping analyses were performed on DNA extracted from tail biopsies, and using the following PCR conditions: 2 min at 94°C for one cycle, 30 s at 94°C, 30 s at 60°C and 40 s at 72°C for 35 cycles, and 4 min at 72°C for one cycle. Genotyping primers are listed in Table 1.

## Primary pituitary cell cultures

Pituitary glands collection and preparation for primary cultures were performed as previously described (31). Briefly, pituitary glands were collected from 12- to 16-week-old male and female cKO (*Yap*<sup>flox/flox</sup>;*Taz*<sup>flox/flox</sup>;*Gnrhr*<sup>Gric/+</sup>) and control (*Yap*<sup>flox/flox</sup>;*Taz*<sup>flox/flox</sup>) mice in M199 medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS). Pituitaries were washed 3 times in HBSS with 150 μmol/L CaCl<sub>2</sub>, cut several times with a scalpel, and digested in collagenase (1.5 mg/mL) (Millipore-Sigma, Burlington, MA, USA; diluted in HBSS with 30 mg/mL BSA, pH 7.4, 40 μL/pituitary) at 37°C for 2 hours. The suspension was then washed with 3 mL calcium-free HBSS, centrifuged for 5 min at 1000 × g, and resuspended in pancreatin solution (Millipore-Sigma; 4.5 mg/mL in calcium-free HBSS; 40 μL/pituitary). Pancreatin digestion was performed in a 37°C water bath with manual agitation for 6 to 8 min. Finally, the cell suspension was washed 3 times in 5 mL M199 media containing 10% (v/v) FBS, and cells were seeded (day 0) at density of 1 × 10<sup>5</sup>/well in 96-well plates. After 24 h, cells were treated or not with 1 μM GnRH (Millipore-Sigma) for 15 or 30 minutes in triplicate, and the experiment was repeated 3 times. Medium was then collected for hormonal assay and cells harvested for total RNA extraction.

## **LβT2 cell culture and treatments**

LβT2 gonadotrope-like cells (gift from Dr. Daniel Bernard, McGill University, Montreal, Canada) were cultured as previously described (32,33). Briefly, LβT2 were seeded (day 0) at density of  $1 \times 10^5$ /well in 48-well plates and cultured in medium DMEM 1X (Wisent, St-Bruno, Quebec, Canada,) supplemented with 10% fetal bovine serum and 4 ug/ml of gentamycin for at least 24 h before the treatments. On the day of the treatments, medium was removed and replaced with medium containing 2% (v/v) FBS. Cells were then pretreated for 1h with 5 uM of verteporfin (VP; Millipore-Sigma,) before challenge with 1uM GnRH. Treatments were performed for 15 min (an adequate pulse length to induce LH secretion in LβT2 cells as previously described (34)) in quadruplicate, and the experiment was repeated 3 times. Medium was then collected for hormonal assay and cells harvested for total RNA extraction.

## **RNA extraction and real time RT-qPCR**

Total RNA from cultured cells (primary pituitary cells or LβT2 gonadotrope-like cells culture) or whole pituitaries was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Toronto, ON, Canada) according to the manufacturer's protocols. RNA quantity and quality were assessed using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo-Fisher Scientific). Total RNA was reverse-transcribed using the SuperScript Vilo cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and qPCR reactions consisted of 2.3 μL of H<sub>2</sub>O, 6 pmol of each forward and reverse gene-specific primer and 7.5 μL of Advanced qPCR mastermix with Supergreen (Wisent). Real-time PCR reactions were run using a CFX96 Real-Time System/C1000 Touch thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The thermal cycling program consisted of: 3 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C, 30 s at 60°C and 30 s at 72°C. mRNA levels were determined using Bio-Rad CFX Manager Software (Bio-Rad). To quantify relative gene expression, the Ct of target gene amplification was normalized to the expression level of a housekeeping gene (*Rpl19*) according to the ratio,  $R = E^{Ct_{Rpl19}} / E^{Ct_{target}}$ , where E is the amplification efficiency for each primer pair according to Pfaffl (35). Primer sequences are listed in Table 2.

## **Double immunofluorescence**

For immunofluorescence (IF) analysis, whole pituitary glands were collected, fixed in 4% paraformaldehyde and paraffin-embedded. Serial sections were prepared at a thickness of 7μm and

double probed with primary antibodies against total TAZ (Ab84927, Abcam, Cambridge, UK; 1:50) and LH $\beta$  (graciously provided by Dr. Daniel Bernard, 1:500) overnight at 4°C. The Mouse on Mouse (M.O.M.) Detection Kit (Vector Laboratories Inc., Burlington, ON, Canada) was used according to manufacturer's instructions and species-specific fluorophore-labeled secondary antibodies were applied for 1 h at room temperature (A21121, A11062, Invitrogen; 1: 1000). Slides were washed and mounted with mounting medium with DAPI (Vector Laboratories Inc.).

### **Hormone measurements**

For FSH and LH serum levels assessment by radioimmunoassay (RIA), blood samples were collected by cardiac puncture prior to euthanasia. Blood was allowed to clot at room temperature for 90 minutes and was centrifuged at 2000 g for 15 minutes at room temperature. Serum samples were transferred to polypropylene tubes and stored at -80°C until use. LH levels in cell culture medium samples was also evaluated by RIA. Intratesticular testosterone levels were determined in testicular homogenates by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). For this, samples were generated by mechanical homogenization of testes in phosphate-buffered saline followed by sonication for 60 seconds. Homogenates were centrifuged at 10,000 g for 5 minutes, and the supernatants were stored at -80°C until use. All assays except measurements of circulating aldosterone levels were performed by the Center for Research in Reproduction at the Ligand Assay and Analysis Core Laboratory of the University of Virginia.

### **Epididymal sperm count and testis and seminal vesicle weigh**

Testis and seminal vesicle were collected from 10-12-week-old cKO and control male mice and weighed. The sperm count analyses were done as previously described (36). Briefly, cauda epididymides were placed in prewarmed (37°C) minimum essential medium (MEM) media containing BSA (3 mg/mL; Thermo Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada), and epididymal ducts were opened to release their contents. The sperm suspension (500  $\mu$ L) was pipetted into a tube containing 2 mL of phosphate-buffered saline and placed in a water bath for 1 min at 60°C to halt sperm motility, and then cooled to room temperature. After gentle mixing, 10  $\mu$ L of sperm suspension was loaded to each side of a hemocytometer and allowed 2 min for the spermatozoa to settle. Counting was done in duplicate and total sperm counts calculated according to previously described guidelines (37).

### **Antral follicle counting and ovary weight**

For the antral follicle counting, ovaries were collected from 6-week-old cKO and control mice in the morning of proestrus which was assessed by visual evaluation of the vaginal opening and by vaginal cytology using Byer's tools for mouse estrus cycle identification (38). The ovaries were weighed, formalin-fixed and paraffin-embedded. In all cases, only the left ovary from each animal was analyzed. Serial sections were prepared at a thickness of 5  $\mu\text{m}$  and every 5th section was stained with hematoxylin and eosin. Antral follicles in which the oocyte nucleus was visible were counted and scored as healthy or atretic as previously described (39).

### **Ovulation rate and fertility trials**

To determine ovulation rates, 8-10-week-old cKO and control mice were housed with 8-10-week-old wild-type males and monitored every morning for the presence of a copulatory plug. Females were sacrificed immediately upon identification of the plug, the oviducts removed and placed in a Petri dish containing sterile saline. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were released by tearing open the ampullae of the oviducts with forceps, and counted under a dissection microscope. To assess fertility, 8-10-week-old cKO and control mice were housed with fertile 8-10-week-old wild-type males and monitored daily for litters. Litter sizes were recorded at birth. The males were removed after 6 months, and the experiment was terminated 22 days later to allow for the birth of a final litter.

### **Statistical analysis**

All statistical analyses were performed using Prism 4.0a (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) software. All the data sets (hormone levels, fertility measures, ovulatory rates, follicle numbers and mRNA abundance) were subjected to the F-test to determine equality of variances. Data were transformed to logarithms if they were not normally distributed. Two-tailed t-tests (Student's) were used when two experimental groups were compared, or ANOVA (with Tukey's multiple comparisons post-test) to compare three or more groups. All data are presented as means  $\pm$  SEM.



## Results

### Generation of gonadotrope-specific *Yap* and *Taz* conditional knockout mice

The expression of YAP and TAZ proteins in mouse postnatal pituitaries was previously reported (27). The authors identified a significant nucleo-cytoplasmic staining throughout the adenohypophysis for both Hippo effectors, but a significant larger number of cells were positive for TAZ. Such study however did not confirm the presence of TAZ nor YAP specifically in gonadotrope cells. For this reason, we first performed a preliminary test with LBT2 gonadotrope-like cells. Briefly, we confirmed by immunoblotting that Hippo effectors are detectable in gonadotrope-like cells but while signal for total TAZ protein was easily detectable, signal for total YAP protein was very weak (data not shown).

To then elucidate the physiological relevance of *Taz* and *Yap* to gonadotropin synthesis and secretion, we generated a gonadotrope-specific conditional knockout mouse model. As mentioned above, although the literature and our preliminary tests suggested that TAZ seem to be the predominant Hippo effector expressed in gonadotrope cells, we decided to generate a cKO for both *Yap* and *Taz*. It is known that these two effectors may be functionally redundant in distinct cell types and there are cases where the deletion of one causes the increase of other for compensatory purposes (40). We therefore generated a double cKO (referred to herein as *Yap*<sup>flox/flox</sup>;*Taz*<sup>flox/flox</sup>;*Gnrhr*<sup>Gric/+</sup> or cKO mice). Animals of both genders were found to be viable, healthy, and otherwise indistinguishable from their littermates without the Cre driver (referred to herein as *Yap*<sup>flox/flox</sup>;*Taz*<sup>flox/flox</sup> or control mice). The specificity of cKO model was validated based on IF results. As LHB $\beta$  is stored in all gonadotrope cells, it can be used to identify this type of cells among various pituitary cell populations (41). So, using antibodies for LHB $\beta$  and for TAZ total proteins, we performed double-labeled IFs that allowed us to determine that TAZ total protein levels in gonadotrope cells were significantly reduced in cKO mice in comparison to respective controls (Fig. 1). As the staining for total YAP in gonadotrope cells was much weaker (or frequently absent) in comparison to total TAZ, it was therefore difficult to determine the recombination efficiency for YAP.

### **Circulating levels of gonadotropins and intratesticular testosterone are increased in cKO male mice**

We first investigated the hormonal profile and some reproductive parameters in adult (10-12-week-old) cKO male mice. The assessment of serum FSH and LH levels and intratesticular testosterone showed us that cKO male mice presented increased circulating levels for both gonadotropins and intratesticular testosterone in comparison to control mice ( $P < 0.05$ , Fig. 2A). To better elucidate the effects of this hormonal increase in males, some reproductive endpoints were also evaluated including epididymal sperm counting and assessment of testes and seminal vesical weight/corporal weight (gonadosomatic index). Although cKO mice presented only a tendency for total sperm count increase ( $P > 0.05$ , Fig. 2B), the sperm density in these animals appeared to be slightly but significantly higher in comparison to controls ( $P < 0.05$ , Fig. 2B). Finally, while testicular weight was slightly higher in cKO ( $P < 0.05$ , Fig. 2C), the seminal vesicle weight was similar between cKO and control male mice ( $P > 0.05$ , Fig. 2B).

### **Gonadotrope specific *Yap/Taz* knockout increases LH (but no FSH) synthesis, ovulatory rates and fertility in female mice**

The data collected from adult cKO male mice clearly indicated that YAP and TAZ participate in the regulation of gonadotropin production *in vivo*. However, the reproductive phenotype observed in males could be considered mild. To better characterize the *Yap/Taz* cKO gonadotropins-linked phenotype and its potential effect on fertility parameters, we then decided to focus our subsequent experiments on the cKO female model. For this, we first selected 6-week-old female control and cKO mice to assess gonadotropin circulating levels and their correlation with follicle development. Surprisingly, different to what was observed in cKO males, only serum levels of LH were significantly higher in female cKO mice ( $P < 0.05$ , Fig. 3A), while serum FSH levels were comparable to controls ( $P > 0.05$ , Fig. 3A). The latter results helped us to understand the antral follicle counting findings which indicated similar total number of antral follicles as well similar number of healthy and atretic antral follicles between control and cKO mice ( $P > 0.05$ , Fig. 3B). In addition, no significant ovary weight differences were detected in the ovaries from cKO mice ( $P > 0.05$ , Fig. 3B).

Due to the significant LH augmentation observed in cKO female mice (Fig. 3A), we then evaluated if such increase would alter the ovulation rate of these mutant mice. Indeed, cKO females ovulated ~4 more COCs following natural mating than controls ( $P>0.05$ , Fig. 3C). To then determine if this increased ovulatory efficiency would improve fertility, we next performed a fertility trial. For this, 8-week-old female control and cKO mice were housed with wild-type males and monitored daily for litters for 6 months, and litter frequency and size were recorded. cKO females were found to be hyperfertile, producing ~2 additional pups per litter on average relative to their controls and consequently a larger number of total pups at the end of the breeding trial ( $P<0.05$ , Table 3).

Taken together, these first series of experiments *in vivo*, using males and females cKO mice, indicated that YAP/TAZ function as negative regulators of gonadotropin production in gonadotrope cells.

### ***In vivo Yap/Taz* depletion does not alter key gonadotropin synthesis-related genes**

To determine if the augmented circulating levels of gonadotropin observed in cKO mice *in vivo* was due to increased transcription of critical gonadotropin synthesis-related genes, and to better understand why females presented an increase in circulating levels for LH but not for FSH (Fig. 3A), we then collected pituitary glands from 10-12-week-old control and cKO from both sexes for RT-qPCR analyses. Although whole pituitaries were collected for these analyses, gene expression for both *Fshb* and *Lhb* are exclusive to gonadotropes (42), so eventual differences due to the cKO should be observed in these samples. However, while a slight increase (but not significant;  $P>0.05$ , Fig. 4B) in *Fshb* mRNA levels only in pituitaries collected from cKO males in comparison to controls (what could somehow help us to explain, at least in part, the slight increase in FSH serum levels only in males cKO), surprisingly mRNA levels for *Lhb* in pituitary glands from cKO were similar to controls in both males and females ( $P>0.05$ , Fig. 4). These findings led us to hypothesize that the negative regulatory effect of Hippo effectors on gonadotropin production verified *in vivo*, was probably not due the transcription suppression on key gonadotropin synthesis-related genes (including *Cga* and *Gnrhr*;  $P>0.05$ , Fig. 4), but could involve the transcriptional and/or post-translational regulation of other targets (genes/proteins) that are directly or indirectly related to the regulatory mechanism underlying basal and GnRH-induced gonadotropin release (particularly LH) in gonadotropes.

### **Basal and GnRH-induced LH secretion is increased in pituitary cells from cKO mice**

To further investigate the effect of selective gonadotrope *Yap/Taz* depletion on the LH-basal and stimulated secretion process, we then isolated pituitary cells from 12 to 16-week-old female and male control and cKO mice and treated them or not with a single pulse of GnRH (1 $\mu$ M) for 15 or 30 minutes. Interestingly, the assessment of LH secreted in the medium showed that pituitary cells isolated from female cKO not only secreted more GnRH-induced but also presented higher basal levels of secreted LH in comparison to similar treatments in cells isolated from control mice ( $P < 0.05$ , Fig. 5A). Although the primary culture performed with cells isolated from male control and cKO mice did not present the same significant differences found in cells from females (only tendencies;  $P > 0.05$ , Fig. 5B), it was observed in male cells the exact same pattern for basal and GnRH-induced LH secretion results observed in females.

### **YAP/TAZ-TEAD interaction inhibition affects basal and GnRH-induced LH secretion in L $\beta$ T2 gonadotrope-like cells**

The previous experiment with primary pituitary cell culture confirmed that gonadotrope-specific depletion of *Yap/Taz* improves the LH release efficiency of these cells, reinforcing that Hippo effectors negatively regulate the LH secretion. To have a better idea on the potential mechanism underlying YAP/TAZ suppressive role in gonadotropes, we then employed a series of *in vitro* cultures using the immortalized gonadotrope cell line L $\beta$ T2. Briefly, these gonadotrope-like cells were pretreated for 1 h with verteporfin (5  $\mu$ M; a small molecule inhibitor that interferes with YAP/TAZ binding to TEAD family of transcription factors) before challenge with a single pulse of GnRH (1 $\mu$ M) for 15 minutes. Interestingly, the results showed that VP pretreatment not only increased the basal levels of LH released into the medium in comparison to the control treatment (no ligand) but also increased the LH levels secreted by cells in response to GnRH challenge ( $P < 0.05$ , Fig. 6). The latter results, once more, could not be explained by the *Lhb* mRNA levels profile in VP-pretreated cells ( $P > 0.05$ , Fig. 6)

Taken together, the last series of *in vitro* findings strongly suggest that TAZ and/or YAP attenuate the gonadotrope LH release (both basal and in response to GnRH), at least in part, via a mechanism involving their bound with the TEAD transcription factor family.

## Discussion

Hippo is an evolutionarily highly conserved signaling pathway with established roles in cell differentiation, proliferation and apoptosis in a variety of cells (22,43). It is considered a critical regulator of morphogenesis, organ size determination and tumorigenesis in many tissues (44,45), including reproductive tissues in mice (46-50). Although recent reports demonstrated activity of the Hippo kinase cascade in the mouse (27) and human (51) pituitaries, these authors focused their studies on showing correlations of this pathway with the pituitary gland development (pre- and post-natal) and that Hippo effectors deregulation can be associated with pituitary tumors formation. At a more functional level, although it was showed in a previous study that YAP and TAZ are critical in the development of the pituitary (169), the novel results showed herein indicate that YAP and TAZ expressed in mouse pituitary gonadotrope cells function as negative regulators of gonadotropins secretion, particularly LH.

Using a conditional gene targeting approach, we found that gonadotrope-specific inactivation of *Yap* and *Taz* resulted in increased circulating levels of FSH and LH in adult cKO male mice, but only LH levels in adult cKO female mice. Initially, we presumed that the slight better recombination efficiency in our male cKO model (in comparison to female cKO model; data not show) could help us to explain such differences. However, when pituitary cells were collected from both 12- to 16-week-old male and female cKO (and respective control mice) to be challenged by GnRH *in vitro*, the LH secretion results surprisingly indicated more significant differences between treatments in female mutant cells relative to controls in comparison to equivalent conditions in male mutant cells cultured *in vitro*. Therefore, we cannot exclude the possibility that these discrepancies could be also explained by known sex-specific differences in pituitary morphology and function (52-56). Nevertheless, it is important to emphasize that there was a similar and consistent LH-related phenotype in cKO animals from both sexes. While the main alterations in reproductive parameters in males were a significant increase in intratesticular testosterone levels followed by a slight increase in testicular weight and sperm density; female cKO mice presented a hyperfertility phenotype characterized by larger litter sizes. In both cases, these findings can be easily explained by the significant increase of circulating levels of LH. In cKO males, such increase led to augmented levels of intratesticular testosterone (whose production is FSH independent (57)), while the larger litter sizes observed in cKO female can be explained by the increased ovulation rates (~ 4 COCs) in these animals.

As mentioned previously, SMAD2/3/4 complexes act as transcription factors in combination with FOXL2 to promote *Fshb* transcription (58); and several studies have established functional interactions between Hippo and the TGF $\beta$ /activin/nodal branch of receptor-regulated SMADs (19,26), suggesting that Hippo pathway inactivation can be considered permissive of TGF $\beta$  signaling (by enabling nuclear SMAD2/3/4 retention). Based on that, we initially hypothesized that the conditional deletion of *Yap* and *Taz* in gonadotrope cells would culminate with an increase in *Fshb* transcription levels, consequently causing a significant augmentation in circulating FSH levels. Intriguingly, there was only a slight (but not significant increase) in *Fshb* mRNA levels in the whole pituitary collected from cKO adult male mice in comparison to controls. Such slight increase, however, could somehow help us to explain (at least in part) the increase in FSH serum levels observed in cKO males in comparison to controls. On the other hand, cKO females not only presented similar *Fshb* mRNA levels in whole pituitary in comparison to respective controls, as the serum FSH levels were also similar. The latter results helped us to understand the antral follicle counting findings, which indicated similar number of total antral follicles as well similar number of healthy and atretic antral follicles between control and cKO female mice. These counting would normally change following the augmentation in FSH levels (59,60). Therefore, the phenotype observed in females was clearly exclusively due to LH increase. At this point, we then decided to focus the next steps of our study on better elucidating the increased capacity of pituitary gonadotrope cells in secreting higher amounts of LH following depletion of *Yap* and *Taz* and following the inhibition of their transcriptional activity.

Our primary cultures employing pituitary cells isolated from cKO animals showed us that these cells not only secreted more GnRH-induced LH but curiously released higher basal levels of this gonadotropin in comparison to similar conditions in cells isolated from control mice. However, most significant differences were observed only in cultures performed with pituitary cells isolated from females cKO. In addition, we expected a more robust response (higher secreted levels of LH into the medium) following the GnRH challenge. A plausible explanation for that involves the fact that these primary cultures were performed not only with isolated gonadotropes but with a mixed population of pituitary cells. Although LH is synthesized and secreted exclusively by gonadotropes (which correspond only to 5-10% of total pituitary cells (1,11)) and, taking into account that *Yap* and *Taz* conditional deletion were gonadotrope-specific, we cannot exclude the possibility of a paracrine effect from YAP and TAZ action from neighbor cells. For example, somatotrope cells

may transition into gonadotropes to support the LH production by upregulating gonadotropin-synthesis related genes expression (54). So, to isolate such potential influence of non-gonadotrope neighbour cells and to gain some insight in the potential mechanism by which YAP/TAZ exert their suppressive role on gonadotrope LH secretion, we then decided to perform a series of cell cultures with the immortalized gonadotrope cell line L $\beta$ T2. Interestingly, when L $\beta$ T2 cells were pretreated with a pharmacological inhibitor that interferes with YAP/TAZ binding to TEAD family of transcription factors (as it was observed in primary cultures with cell from cKO), both basal and GnRH-induced LH secretion in VP-pretreated cells were significantly higher in comparison to control. Most interestingly, similar to what was observed in whole pituitary from cKO *in vivo*, the *Lhb* mRNA profile in L $\beta$ T2 cell pretreated with VP could not explain the augmented LH secretion release, therefore reinforcing the fact that YAP/TAZ suppressive effect apparently does not involve *Lhb* transcriptional regulation.

Although the GnRH-induced *Lhb* expression is a critical and well established event to control LH synthesis (5,10,11), when GnRH binds to its receptors in gonadotropes, it also initiates a cascade of events that ultimately promote the trafficking of LH vesicles to the cell periphery where the gonadotrope cells display morphological plasticity which allows a directed mobilization of cytoskeletal processes towards vascular elements to facilitate a rapid LH secretion into peripheral circulation (61). It has been demonstrated that primary pituitary cells concentrate LH $\beta$  into areas of dynamic membrane reorganization following GnRH treatment, and that the disruption of the actin cytoskeleton alters LH release pattern (62). Another important event involves the position of LH secretory granules. It has been reported in ovine pituitary cells that the number of polarized LH granules is significantly increased during the preovulatory LH surge (41,62,63). Taking into account that it has been shown that Hippo pathway regulates the actin cytoskeleton in several cell types and contexts (64,65), future studies will be, therefore, essential to elucidate the roles of Hippo effectors on functional and organizational plasticity of gonadotropes, particularly on the involvement of the Hippo pathway with the engagement of the actin cytoskeleton and synthesis and polarization of LH granules in murine gonadotropes.

In summary, we report for the first time the physiological roles of YAP and TAZ in gonadotropes. We provide evidence herein that conditional deletion of *Yap* and *Taz* in mouse gonadotropes results in increased circulating levels of LH in both male and female cKO models, which led these animals to present hyperfertility phenotypes (particularly females). The Hippo

pathway suppressive effect on gonadotropin secretion is caused, at least in part, by YAP and TAZ bound to the TEAD family of transcriptional factors.

## Acknowledgments

The authors thank Mr. Francis Bourgeois for assistance with the mouse colony management and his contribution to *in vitro* experiments; and Mrs. Marie-Noëlle Laguë for assistance with IF protocol optimization (both from Université de Montréal). We also thank Mrs. Ying Wang and Mrs. Luisina Ongaro (from McGill University) for their precious advice for LBT2 cell culture optimization. Finally, the authors thank Eric Olson (UT Southwestern Medical Center) for generously providing Yap<sup>flox/flox</sup>, Taz<sup>flox/flox</sup> mice.

## References:

1. Bernard DJ, Tran S. Mechanisms of activin-stimulated FSH synthesis: the story of a pig and a FOX. *Biol Reprod.* 2013;88(3):78.
2. Bernard DJ, Fortin J, Wang Y, Lamba P. Mechanisms of FSH synthesis: what we know, what we don't, and why you should care. *Fertil Steril.* 2010;93(8):2465-2485.
3. Ma X, Dong Y, Matzuk MM, Kumar TR. Targeted disruption of luteinizing hormone beta-subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(49):17294-17299.
4. Kumar T, Wang Y, Lu N, Matzuk M. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature Genetics.* 1997;15:201-204.
5. Fortin J, Kumar V, Zhou X, Wang Y, Auwerx J, Schoonjans K, Boehm U, Boerboom D, Bernard DJ. NR5A2 regulates Lhb and Fshb transcription in gonadotrope-like cells in vitro, but is dispensable for gonadotropin synthesis and fertility in vivo. *PLoS One.* 2013;8(3):e59058.
6. Ferris HA, Shupnik MA. Mechanisms for pulsatile regulation of the gonadotropin subunit genes by GnRH1. *Biol Reprod.* 2006;74(6):993-998.
7. Tremblay JJ, Drouin J. Egr-1 is a downstream effector of GnRH and synergizes by direct interaction with Ptx1 and SF-1 to enhance luteinizing hormone beta gene transcription. *Molecular and Cellular Biology.* 1999;19(4):2567-2576.



8. Bliss SP, Miller A, Navratil AM, Xie JJ, McDonough SP, Fisher PJ, Landreth GE, Roberson MS. ERK Signaling in the Pituitary Is Required for Female But Not Male Fertility. *Molecular Endocrinology*. 2009;23(7):1092-1101.
9. Liu FJ, Austin DA, Mellon PL, Olefsky JM, Webster NJG. GnRH activates ERK1/2 leading to the induction of c-fos and LH beta protein expression in L beta T2 cells. *Molecular Endocrinology*. 2002;16(3):419-434.
10. Jin JM, Yang WX. Molecular regulation of hypothalamus-pituitary-gonads axis in males. *Gene*. 2014;551(1):15-25.
11. Thackray VG, Mellon PL, Coss D. Hormones in synergy: regulation of the pituitary gonadotropin genes. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;314(2):192-203.
12. Jorgensen JS, Quirk CC, Nilson JH. Multiple and overlapping combinatorial codes orchestrate hormonal responsiveness and dictate cell-specific expression of the genes encoding luteinizing hormone. *Endocr Rev*. 2004;25(4):521-542.
13. Dorn C, Ou Q, Svaren J, Crawford PA, Sadovsky Y. Activation of luteinizing hormone beta gene by gonadotropin-releasing hormone requires the synergy of early growth response-1 and steroidogenic factor-1. *J Biol Chem*. 1999;274(20):13870-13876.
14. Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, Guillemin R. Pituitary Fsh Is Released by a Heterodimer of the Beta-Subunits from the 2 Forms of Inhibin. *Nature*. 1986;321(6072):779-782.
15. Fortin J, Boehm U, Weinstein MB, Graff JM, Bernard DJ. Follicle-stimulating hormone synthesis and fertility are intact in mice lacking SMAD3 DNA binding activity and SMAD2 in gonadotrope cells. *FASEB J*. 2014;28(3):1474-1485.
16. Li Y, Schang G, Boehm U, Deng CX, Graff J, Bernard DJ. SMAD3 Regulates Follicle-stimulating Hormone Synthesis by Pituitary Gonadotrope Cells in Vivo. *J Biol Chem*. 2017;292(6):2301-2314.
17. Ongaro L, Zhou X, Cui Y, Boehm U, Bernard DJ. Gonadotrope-specific deletion of the BMP type 2 receptor does not affect reproductive physiology in micedaggerdouble dagger. *Biol Reprod*. 2020;102(3):639-646.
18. Coss D, Thackray VG, Deng CX, Mellon PL. Activin regulates luteinizing hormone beta-subunit gene expression through smad-binding and homeobox elements. *Molecular Endocrinology*. 2005;19(10):2610-2623.

19. Grannas K, Arngarden L, Lonn P, Mazurkiewicz M, Blokzijl A, Zieba A, Soderberg O. Crosstalk between Hippo and TGFbeta: Subcellular Localization of YAP/TAZ/Smad Complexes. *J Mol Biol.* 2015;427(21):3407-3415.
20. Hong W, Guan KL. The YAP and TAZ transcription co-activators: key downstream effectors of the mammalian Hippo pathway. *Semin Cell Dev Biol.* 2012;23(7):785-793.
21. Meng Z, Moroishi T, Guan KL. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev.* 2016;30(1):1-17.
22. Zhao B, Tumaneng K, Guan KL. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat Cell Biol.* 2011;13(8):877-883.
23. Zhao B, Li L, Tumaneng K, Wang CY, Guan KL. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes Dev.* 2010;24(1):72-85.
24. Liu CY, Zha ZY, Zhou X, Zhang H, Huang W, Zhao D, Li TT, Chan SW, Lim CJ, Hong WJ, Zhao SM, Xiong Y, Lei QY, Guan KL. The Hippo Tumor Pathway Promotes TAZ Degradation by Phosphorylating a Phosphodegron and Recruiting the SCF beta-TrCP E3 Ligase. *Journal of Biological Chemistry.* 2010;285(48):37159-37169.
25. Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, Xie J, Ikenoue T, Yu J, Li L, Zheng P, Ye K, Chinnaiyan A, Halder G, Lai ZC, Guan KL. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* 2007;21(21):2747-2761.
26. Ben Mimoun S, Mauviel A. Molecular mechanisms underlying TGF-ss/Hippo signaling crosstalks - Role of baso-apical epithelial cell polarity. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018;98:75-81.
27. Lodge EJ, Russell JP, Patist AL, Francis-West P, Andoniadou CL. Expression Analysis of the Hippo Cascade Indicates a Role in Pituitary Stem Cell Development. *Front Physiol.* 2016;7:114.
28. Xin M, Kim Y, Sutherland LB, Qi X, McAnally J, Schwartz RJ, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. Regulation of insulin-like growth factor signaling by Yap governs cardiomyocyte proliferation and embryonic heart size. *Sci Signal.* 2011;4(196):ra70.
29. Xin M, Kim Y, Sutherland LB, Murakami M, Qi X, McAnally J, Porrello ER, Mahmoud AI, Tan W, Shelton JM, Richardson JA, Sadek HA, Bassel-Duby R, Olson EN. Hippo

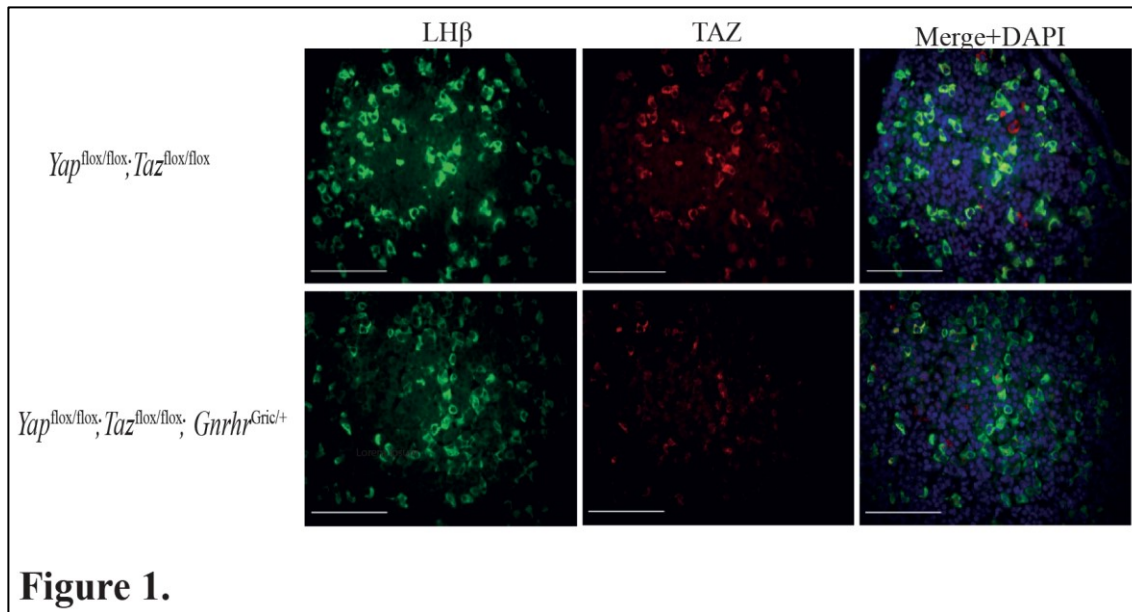
- pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(34):13839-13844.
30. Wen S, Ai W, Alim Z, Boehm U. Embryonic gonadotropin-releasing hormone signaling is necessary for maturation of the male reproductive axis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(37):16372-16377.
  31. Li Y, Fortin J, Ongaro L, Zhou X, Boehm U, Schneyer A, Bernard DJ, Lin HY. Betaglycan (TGFBR3) Functions as an Inhibin A, but Not Inhibin B, Coreceptor in Pituitary Gonadotrope Cells in Mice. *Endocrinology*. 2018;159(12):4077-4091.
  32. Bernard DJ. Both SMAD2 and SMAD3 mediate activin-stimulated expression of the follicle-stimulating hormone beta subunit in mouse gonadotrope cells. *Mol Endocrinol*. 2004;18(3):606-623.
  33. Lamba P, Santos MM, Philips DP, Bernard DJ. Acute regulation of murine follicle-stimulating hormone beta subunit transcription by activin A. *J Mol Endocrinol*. 2006;36(1):201-220.
  34. Turgeon JL, Kimura Y, Waring DW, Mellon PL. Steroid and pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) regulation of luteinizing hormone and GnRH receptor in a novel gonadotrope cell line. *Mol Endocrinol*. 1996;10(4):439-450.
  35. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.
  36. Boyer A, Girard M, Thimmanahalli DS, Levasseur A, Celeste C, Paquet M, Duggavathi R, Boerboom D. mTOR Regulates Gap Junction Alpha-1 Protein Trafficking in Sertoli Cells and Is Required for the Maintenance of Spermatogenesis in Mice. *Biol Reprod*. 2016;95(1):13.
  37. Wang Y. Epididymal sperm count. *Curr Protoc Toxicol*. 2003;Chapter 16:Unit16 16.
  38. Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA. Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One*. 2012;7(4):e35538.
  39. Boyer A, Lapointe E, Zheng XF, Cowan RG, Li HG, Quirk SM, DeMayo FJ, Richards JS, Boerboom D. WNT4 is required for normal ovarian follicle development and female fertility. *Faseb Journal*. 2010;24(8):3010-3025.

40. Plouffe SW, Lin KC, Moore JL, Tan FE, Ma SH, Ye Z, Qiu YJ, Ren B, Guan KL. The Hippo pathway effector proteins YAP and TAZ have both distinct and overlapping functions in the cell. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293(28):11230-11240.
41. McNeilly AS, Crawford, J. L., Taragnat, C., Nicol, L., & McNeilly, J. R. . The differential secretion of FSH and LH- regulation through genes, feedback and packaging. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-SUPPLEMENT*. 2003:463-476.
42. Yeung CM, Chan CB, Leung PS, Cheng CH. Cells of the anterior pituitary. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(9):1441-1449.
43. Yu FX, Guan KL. The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes Dev*. 2013;27(4):355-371.
44. Mo JS, Park HW, Guan KL. The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO Rep*. 2014;15(6):642-656.
45. Yu FX, Zhao B, Guan KL. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell*. 2015;163(4):811-828.
46. Tsoi M, Morin M, Rico C, Johnson RL, Paquet M, Gevry N, Boerboom D. Lats1 and Lats2 are required for ovarian granulosa cell fate maintenance. *FASEB J*. 2019;33(10):10819-10832.
47. Levasseur A, Paquet M, Boerboom D, Boyer A. Yes-associated protein and WW-containing transcription regulator 1 regulate the expression of sex-determining genes in Sertoli cells, but their inactivation does not cause sex reversal. *Biol Reprod*. 2017;97(1):162-175.
48. Abou Nader N, Levasseur A, Zhang X, Boerboom D, Nagano MC, Boyer A. Yes-associated protein expression in germ cells is dispensable for spermatogenesis in mice. *Genesis*. 2019;57(10):e23330.
49. St-Jean G, Tsoi M, Abedini A, Levasseur A, Rico C, Morin M, Djordjevic B, Miinalainen I, Kaarteenaho R, Paquet M, Gevry N, Boyer A, Vanderhyden B, Boerboom D. Lats1 and Lats2 are required for the maintenance of multipotency in the Mullerian duct mesenchyme. *Development*. 2019;146(20).
50. Godin P, Tsoi M, Paquet M, Boerboom D. YAP and TAZ are required for the postnatal development and the maintenance of the structural integrity of the oviduct. *Reproduction*. 2020;160(2):307-318.

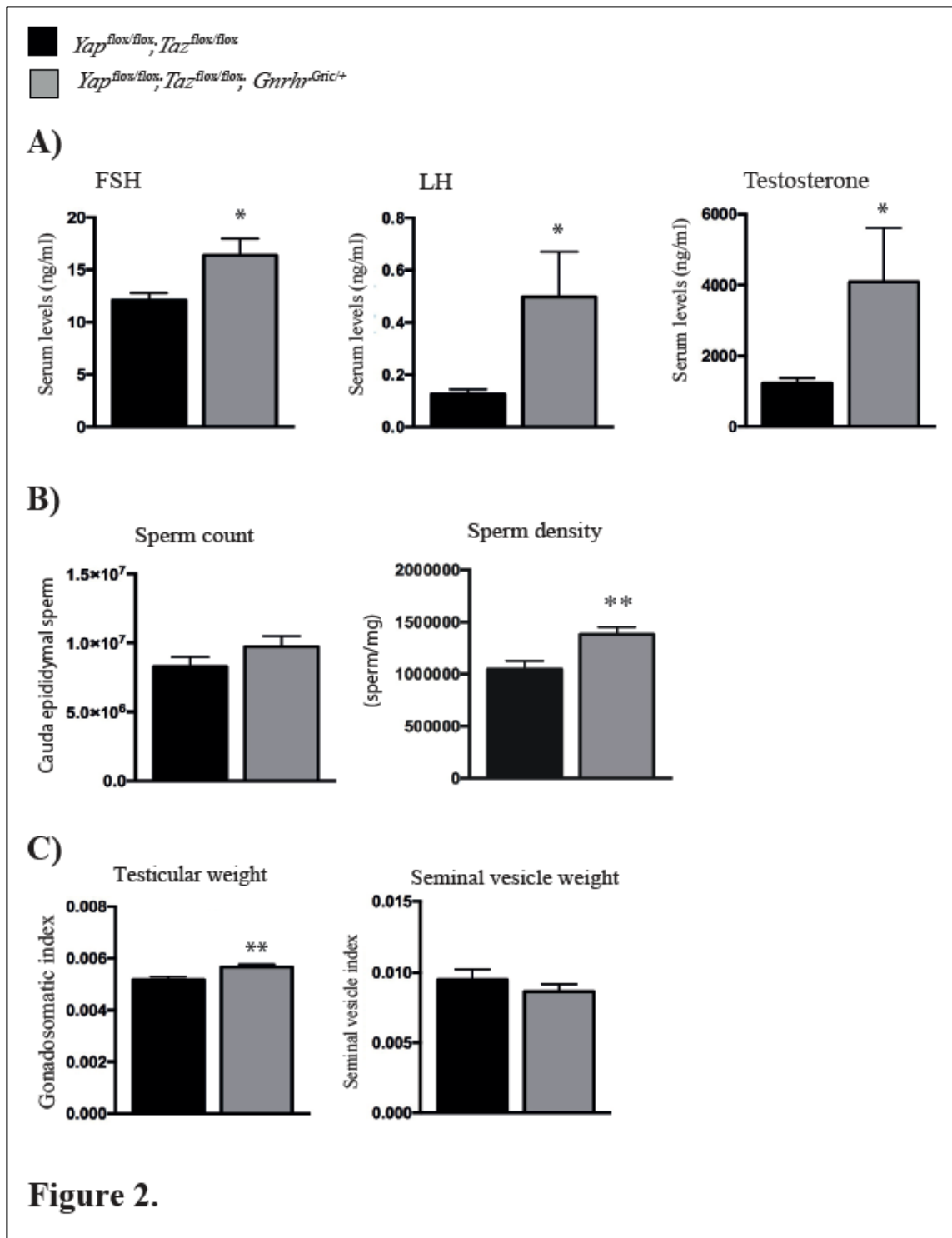
51. Xekouki P, Lodge EJ, Matschke J, Santambrogio A, Apps JR, Sharif A, Jacques TS, Aylwin S, Prevot V, Li R, Flitsch J, Bornstein SR, Theodoropoulou M, Andoniadou CL. Non-secreting pituitary tumours characterised by enhanced expression of YAP/TAZ. *Endocr Relat Cancer*. 2019;26(1):215-225.
52. Ho Y, Hu P, Peel MT, Chen S, Camara PG, Epstein DJ, Wu H, Liebhaber SA. Single-cell transcriptomic analysis of adult mouse pituitary reveals sexual dimorphism and physiologic demand-induced cellular plasticity. *Protein Cell*. 2020;11(8):565-583.
53. Clay CM, Cherrington BD, Navratil AM. Plasticity of Anterior Pituitary Gonadotrope Cells Facilitates the Pre-Ovulatory LH Surge. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:616053.
54. Childs GV. Growth hormone cells as co-gonadotropes: Partners in the regulation of the reproductive system. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2000;11(5):168-175.
55. Nunez L, Villalobos C, Senovilla L, Garcia-Sancho J. Multifunctional cells of mouse anterior pituitary reveal a striking sexual dimorphism. *J Physiol*. 2003;549(Pt 3):835-843.
56. Fletcher PA, Smiljanic K, Maso Previde R, Iben JR, Li T, Rokic MB, Sherman A, Coon SL, Stojilkovic SS. Cell Type- and Sex-Dependent Transcriptome Profiles of Rat Anterior Pituitary Cells. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:623.
57. Schang G, Ongaro L, Schultz H, Wang Y, Zhou X, Brule E, Boehm U, Lee SJ, Bernard DJ. Murine FSH Production Depends on the Activin Type II Receptors ACVR2A and ACVR2B. *Endocrinology*. 2020;161(7).
58. Tran S, Lamba P, Wang Y, Bernard DJ. SMADs and FOXL2 synergistically regulate murine FSHbeta transcription via a conserved proximal promoter element. *Mol Endocrinol*. 2011;25(7):1170-1183.
59. McGee EA, Perlas E, LaPolt PS, Tsafiriri A, Hsueh AJ. Follicle-stimulating hormone enhances the development of preantral follicles in juvenile rats. *Biol Reprod*. 1997;57(5):990-998.
60. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*. 2000;21(2):200-214.
61. Alim Z, Hartshorn C, Mai O, Stitt I, Clay C, Tobet S, Boehm U. Gonadotrope Plasticity at Cellular and Population Levels. *Endocrinology*. 2012;153(10):4729-4739.

62. Navratil AM, Dozier MG, Whitesell JD, Clay CM, Roberson MS. Role of Cortactin in Dynamic Actin Remodeling Events in Gonadotrope Cells. *Endocrinology*. 2014;155(2):548-557.
63. Currie RJW, Mcneilly AS. Mobilization of Lh Secretory Granules in Gonadotrophs in Relation to Gene-Expression, Synthesis and Secretion of Lh during the Preovulatory Phase of the Sheep Estrous-Cycle. *Journal of Endocrinology*. 1995;147(2):259-270.
64. Pflieger CM. The Hippo Pathway: A Master Regulatory Network Important in Development and Dysregulated in Disease. *Protein Kinases in Development and Disease*. 2017;123:181-+.
65. Seo J, Kim J. Regulation of Hippo signaling by actin remodeling. *Bmb Reports*. 2018;51(3):151-156.

**Figures and figure legends:**

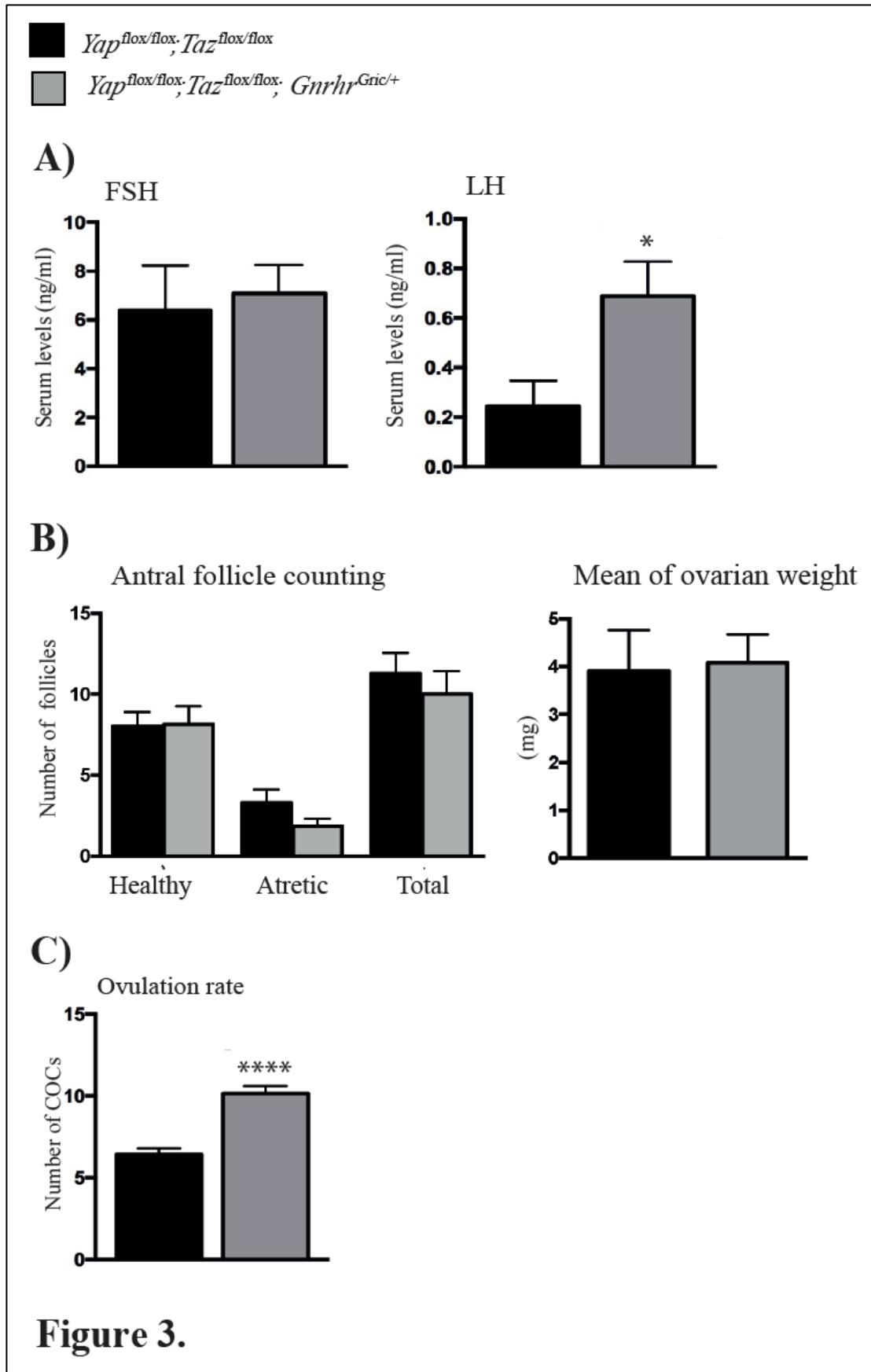


**Figure 1. Gonadotrope-specific conditional knockout validation.** TAZ protein levels in gonadotrope cells from pituitary glands isolated from 10 to 12-week-old control (*Yap<sup>flox/flox</sup>;Taz<sup>flox/flox</sup>*) and cKO (*Yap<sup>flox/flox</sup>;Taz<sup>flox/flox</sup>;Gnrhr<sup>Gric/+</sup>*) male mice. Representative IF images of staining for TAZ (red) in an adenohypophysis region with significant positive staining for the gonadotrope cells marker LHβ (green). Overlays (merge) of the two images are also shown with the nuclei labeled with DAPI (blue). Scale bars=100μm.

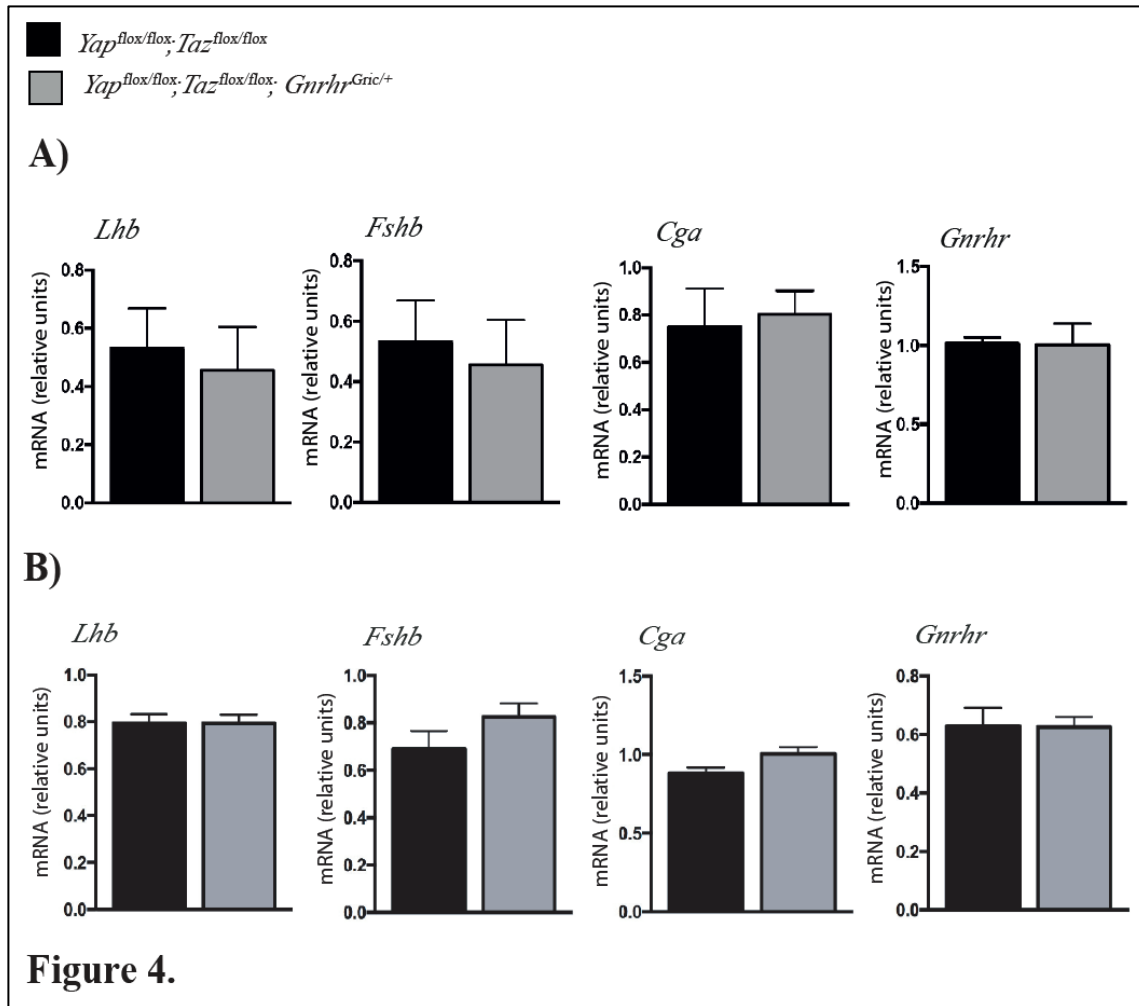




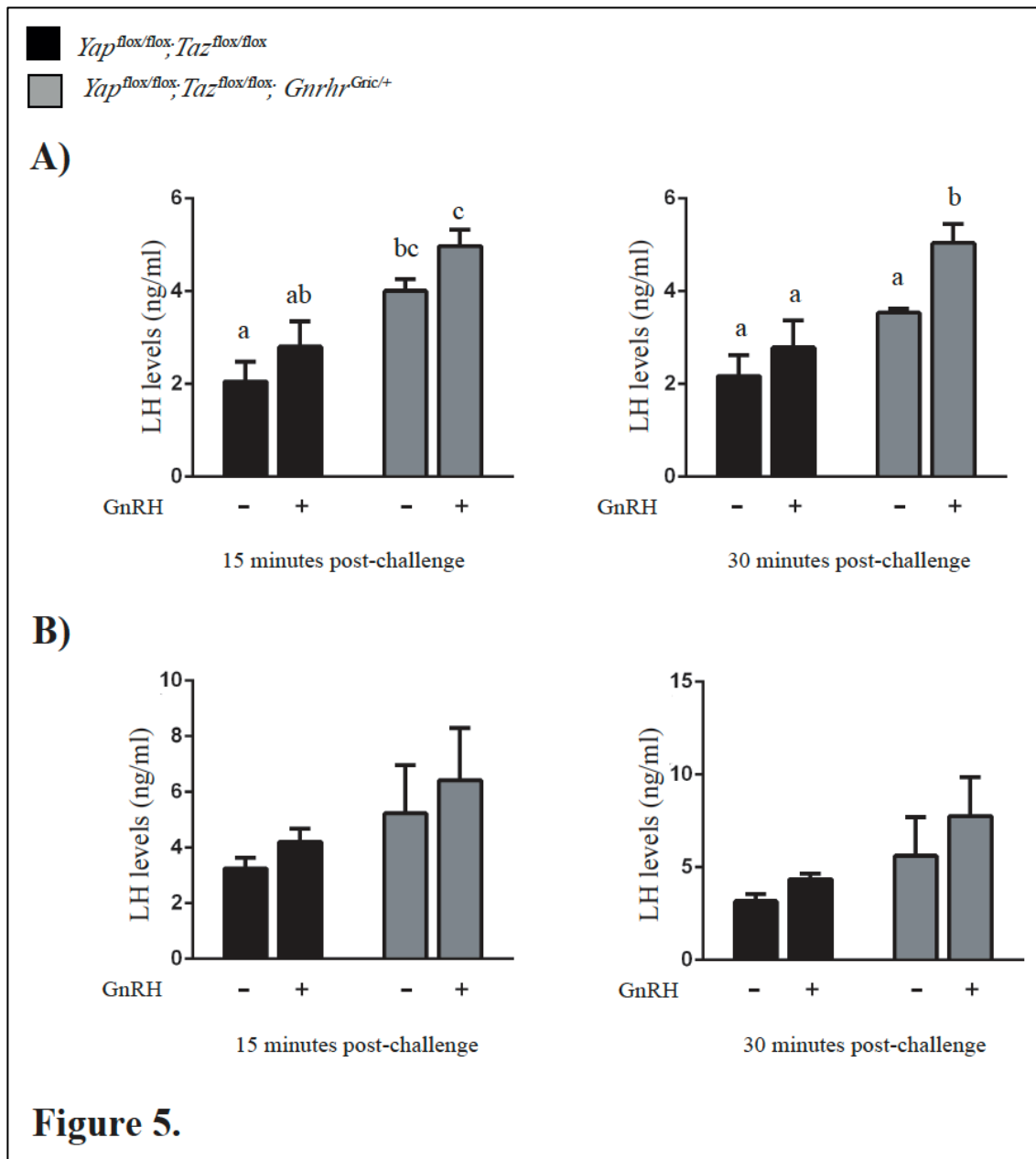
**Figure 2. Effects of gonadotrope specific *Yap/Taz* knockout in male mice.** For all analyses, samples were collected from 10-12-week-old cKO (n=11) and control (n=8) male mice. **A)** Blood samples were collected by cardiac puncture and serum obtained by centrifugation. LH and FSH levels were measured by RIA, and intratesticular testosterone was measured in testicular homogenates by ELISA. **B)** For sperm counting, cauda epididymides were collected, weighed and placed in prewarmed solution, and epididymal ducts were opened to release their contents. **C)** Assessment of testes and seminal vesical weight/corporal weight (gonadosomatic index). All data are expressed as means  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .



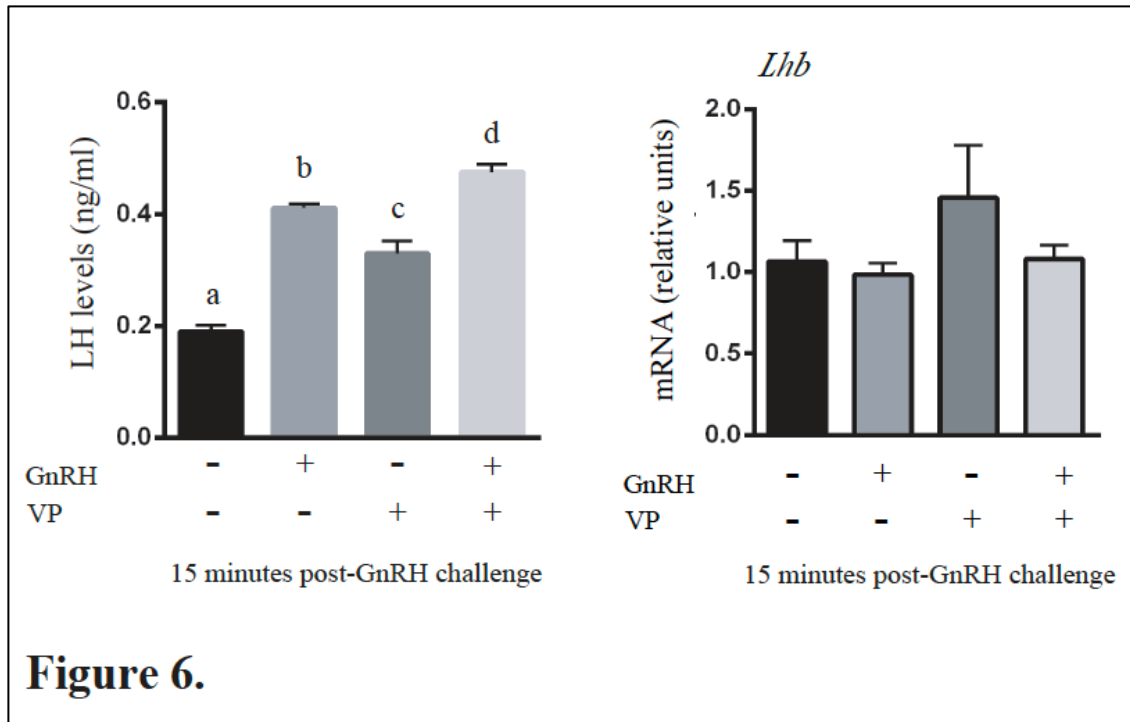
**Figure 3. Effects of gonadotrope specific *Yap/Taz* knockout in female mice.** For hormonal assay and ovarian antral follicle counting, samples were collected from mature 42-day-old control (n=7) and cKO (n=7) female mice. **A)** Blood samples were collected by cardiac puncture and serum obtained by centrifugation. LH and FSH levels were measured by RIA. **B)** Left ovaries were isolated and prepared for follicle counting (serially sectioned). All antral follicles were counted and scored as either healthy or atretic. Data (means  $\pm$  SEM) represent raw follicle count numbers and were not adjusted to estimate the total ovarian follicle population. **C)** For the ovulatory rate experiment, 8-10-week-old cKO (n=7) and control (n=7) female mice were housed with wild-type males and following mating, COCs were retrieved from the oviducts and counted. All data are expressed as means  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .



**Figure 4.** Expression pattern of gonadotropin synthesis-related genes in whole pituitary gland. For all analyses, pituitary glands were collected from 10-12-week-old mice. **A)** Data represent control (n=7) and cKO (n=7) **female mice**. **B)** Data represent control (n=8) and cKO (n=11) **male mice**. mRNA levels were determined by RT-qPCR and normalized to the housekeeping gene *Rpl19*. Data are expressed as means  $\pm$  SEM.  $P > 0.05$ .



**Figure 5.** Basal and GnRH-induced LH secretion in pituitary cells from cKO mice. Pituitary cells were isolated from 12 to 16-week-old (A) female and (B) male control and cKO mice and seeded into cell culture plates. After 24 h, cells were treated or not with a single pulse of GnRH (1  $\mu$ M) for 15 or 30 minutes and the cell culture medium was harvested for LH assessment by RIA. Different letters show statistically significant differences between groups.  $P < 0.05$ .



**Figure 6.** Effects of YAP/TAZ-TEAD interaction inhibition in LH release pattern in immortalized gonadotrope cell line. L $\beta$ T2 gonadotrope-like cells were pretreated for 1 h with 5 uM of verteporfin (VP; a small molecule inhibitor that interferes with YAP/TAZ binding to TEAD family of transcription factors) before challenge with a single pulse of GnRH (1uM) for 15 minutes. **A)** Cell culture medium was harvested for LH assessment by RIA; **B)** and cells were collected for RNA extraction. mRNA levels were determined by RT-qPCR and normalized to the housekeeping gene Rpl19. Different letters show statistically significant differences between groups.  $P < 0.05$ .

**Tables:****Table 1. Genotyping primers**

Primer name	Sequence
<i>Yap-F</i>	ACATGTAGGTCTGCATGCCAGAGGAGG
<i>Yap-R</i>	AGGCTGAGACAGGAGGATCTCTGT-GAG
<i>Taz-F</i>	GGCTTGTGACAAAGAACCTGGGGCTATCTGAG
<i>Taz-R</i>	CCCACAGTTAAATGCTTCTCCAAGACTGGG
GRIC-F	GGACATGTTTCAGGGATCGCCAGGC
GRIC-R	GCATAACCAGTGAAACAGCATTGCTG

**Table 2. qPCR primers**

Primer name	Sequence
<i>Yap-F</i>	GACGCTGATGAATTCTGCCTCA
<i>Yap-R</i>	CATGGCAAACGAGGGTCC
<i>Taz-F</i>	ACTGGCCAGAGATACTTCCTTAATC
<i>Taz-R</i>	AGGCTGATTCATCACCTTCCTG
<i>Fshb-F</i>	GTGCGGGCTACTGCTACACT
<i>Fshb-R</i>	CAGGCAATCTTACGGTCTCG
<i>Lhb-F</i>	ACTGTGCCGGCCTGTCAACG
<i>Lhb-R</i>	AGCAGCCGGCAGTACTCGGA
<i>Cga-F</i>	TCCCTCAAAAAGTCCAGAGC
<i>Cga-R</i>	GAAGAGAATGAAGAATATGCAG
<i>Gnrhr-F</i>	TTCGCTACCTCCTTTGTCGT
<i>Gnrhr-R</i>	CACGGGTTTAGGAAAGCAA
<i>Rpl19-F</i>	CTGAAGGTCAAAGGGAATGTG
<i>Rpl19-R</i>	GGACAGAGTCTTGATGATCTC

**Table 3. Fertility trial**

	<i>Yap</i> <sup>flox/flox</sup> ; <i>Taz</i> <sup>flox/flox</sup>	<i>Yap</i> <sup>flox/flox</sup> ; <i>Taz</i> <sup>flox/flox</sup> ; <i>Gnrhr</i> <sup>Gric/+</sup>
n	8	7
Number of litters	7.0 ± 0.0	6.8 ± 0.1
Total pups	47.5 ± 1.5	59.4 ± 0.7*
Litter size	6.9 ± 0.2	8.7 ± 0.2*

Data are means ± SEM. \*Asterisk indicate significant difference between groups.  $P < 0.05$ .



## Chapitre 4. Discussion

### 1. Importance d'étudier la synthèse des gonadotrophines

L'endocrinologie de la reproduction est la pierre angulaire de la pharmacologie de la fertilité. Actuellement, les méthodes de contraception ou d'amélioration de la fertilité se reposent principalement sur les hormones stéroïdiennes (œstrogène, progestérone) et les gonadotrophines FSH et LH (176). Ces hormones sont utilisées, aussi bien en médecine vétérinaire et en médecine humaine, pour contrôler des paramètres de la fertilité. Nous avons donc une connaissance approfondie des rôles qu'occupent ces hormones et de leur mode d'action surtout dans les gonades. Cependant, les mécanismes régissant la synthèse de ces hormones ne sont toujours pas complètement élucidés. Comment l'hypophyse traduit-elle le signal de l'hypothalamus en sécrétion de la FSH et la LH ? Quels sont les facteurs de signalisation impliqués ? Quelques-uns ont déjà été bien identifiés, mais d'autres restent à découvrir. L'étude de nouvelles voies de signalisation impliquées dans la synthèse et la sécrétion des gonadotrophines pourrait permettre le développement de nouvelles cibles thérapeutiques pour le contrôle de la fertilité, ne serait-ce que pour résoudre ou minimiser les troubles de la fertilité liés à la dérégulation dans la production de gonadotrophines.

### 2. Nouveau rôle de la voie Hippo dans l'hypophyse

La voie Hippo, d'abord découverte chez la drosophile, est une voie de signalisation dont le rôle est de moduler la prolifération cellulaire, l'apoptose et la différenciation cellulaire. Elle est principalement étudiée dans le cadre de la tumorigenèse. Des éléments de cette voie ont récemment été identifiés dans l'hypophyse murine et humaine (168,170). De plus, les effecteurs de la voie Hippo, YAP/TAZ peuvent interagir avec les SMADs, des éléments de la voie des TGF $\beta$ s, en exerçant un rôle inhibiteur sur la transcription des gènes cibles des TGF $\beta$ s. Des éléments de la voie des TGF $\beta$ s, les activines, ont été découverts sur la base de leur capacité à réguler la synthèse de FSH $\beta$ . En regard de ces informations, nous avons formulé l'hypothèse initiale de que YAP/TAZ soient impliqués dans la régulation de la synthèse des gonadotrophines, en particulier de la FSH. Cependant, cette hypothèse a été rapidement infirmée lors d'une de nos expériences préliminaires. Selon notre hypothèse initiale, la délétion de *Yap/Taz* dans l'hypophyse de nos souris mutantes

augmenterait la liaison de SMAD sur le promoteur de *Fshb*. En effectuant un séquençage par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP-Seq) sur les hypophyses de nos souris mutantes et contrôles avec SMAD3 (la SMAD ayant le rôle le plus significatif dans la synthèse de la FSH *in vivo* (177)), nous n'avons pas observé d'augmentation des liaisons sur le promoteur de *Fshb*. Ce résultat nous a finalement incité à mettre de côté l'implication de SMAD.

Dans cette étude, par contre, nous démontrons pour la première fois un rôle physiologique important de YAP/TAZ pas dans la synthèse, mais surtout dans la sécrétion des gonadotrophines chez les mammifères, en particulier par rapport à la sécrétion de la LH. Pour mieux investiguer ce rôle, nous avons créé un modèle de souris en inactivant conditionnellement *Yap/Taz* dans les cellules gonadotropes de l'hypophyse en utilisant le promoteur de GnRHR, un récepteur spécifique aux cellules gonadotropes. La délétion de *Yap/Taz* dans les cellules gonadotropes a provoqué une augmentation dans les taux sériques des gonadotrophines chez les souris mâles et femelles, créant par conséquent un phénotype d'hyperfertilité dans les deux sexes. Curieusement, alors que le mâle présentait des concentrations en FSH et en LH augmentées associées à un accroissement de la taille des testicules et de la densité du sperme, chez la femelle, seuls les niveaux de la LH semblaient significativement augmentés. Cependant, cette hausse de la LH était responsable d'une augmentation du taux d'ovulation et du nombre de souriceaux par portée. Une hausse de sécrétion de la LH a été observée aussi dans des cellules gonadotropes immortalisées suivant l'inhibition de l'action de YAP/TAZ, suggérant que les effecteurs Hippo peuvent exercer un effet suppressif important sur la sécrétion de la LH.

### **3. Méthodes de recherche utilisées : avantages et limites.**

Le plus grand défi de la recherche sur les cellules gonadotropes est le fait que ces cellules ne représentent qu'un faible pourcentage (5-15%) de la population cellulaire constituant l'hypophyse. Il est donc difficile de les isoler et de les cibler. Les différentes méthodes employées dans ce projet pour étudier les mécanismes moléculaires et la fonction endocrinienne des cellules gonadotropes seront davantage discutés dans cette section.

### 3.1 Approches *in vitro* de base

La recherche *in vitro* représente une grande part des techniques employées pour étudier les cellules gonadotropes. On peut soit mettre en culture des cellules d'hypophyse récoltées d'un modèle de souris d'intérêt ou utiliser des cellules gonadotropes de lignée immortalisées.

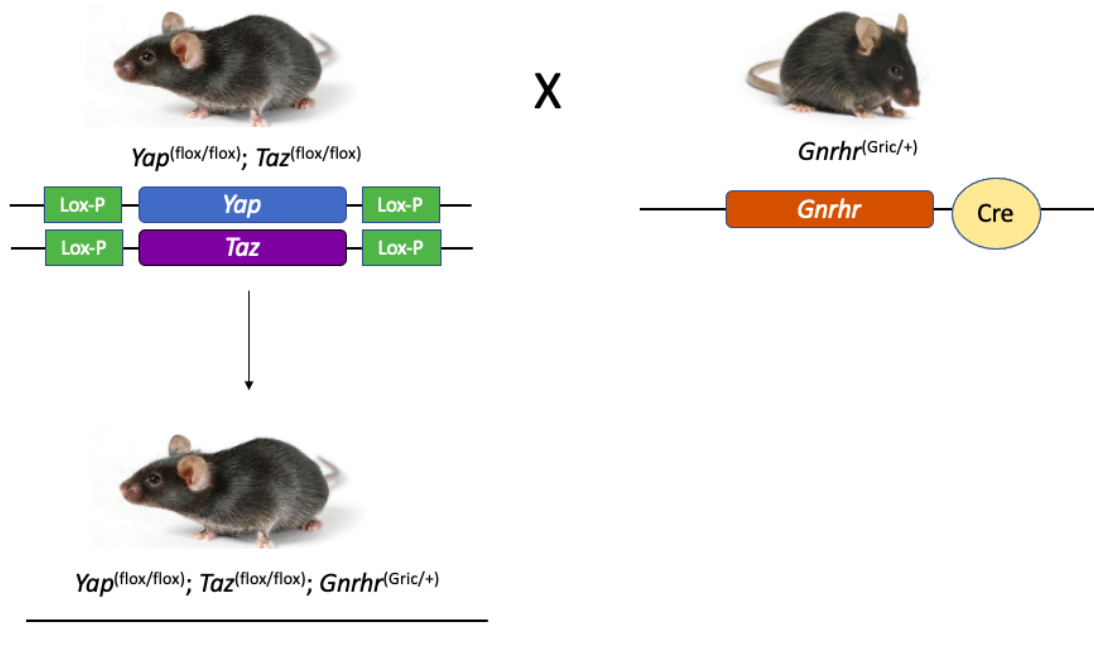
Les cultures primaires d'hypophyse entière sont relativement simple à exécuter et permettent d'effectuer certaines manipulations afin d'obtenir des résultats préliminaires. Toutefois, ce n'est pas le modèle idéal pour étudier les cellules gonadotropes, en raison de leur faible nombre et de l'hétérogénéité cellulaire de l'hypophyse. En effet, il est impossible de s'assurer de la spécificité d'une réponse, les autres cellules pouvant également intervenir et brouiller le signal. Cependant, comme la FSH et la LH sont des hormones produites spécifiquement par les cellules gonadotropes, le signal, bien que dilué dans la masse cellulaire hypophysaire, peut être détecté. Afin de contourner ce problème, il est possible mettre en culture uniquement les cellules gonadotropes, mais ce protocole est plus complexe. Afin d'analyser chaque cellule séparément et purifier les gonadotropes, l'utilisation d'une cytométrie de flux est requise (177). Toutefois, il faut indiquer au cytomètre de flux comment identifier et sélectionner les cellules gonadotropes parmi toutes les cellules de l'hypophyse. Des modèles de souris transgéniques ont été créés pour faciliter la purification des cellules gonadotropes *in vitro*. Les gonadotropes de ces souris sont étiquetées *in vivo* avec un antigène de surface transgénique (H-2K<sup>k</sup>) exprimé par le promoteur de *Fshb*, qui facilite leur purification *in vitro* avec des microbilles paramagnétiques anti-H-2K<sup>k</sup> (178). Les cellules gonadotropes d'un autre modèle produisent une protéine jaune fluorescente exprimée par le promoteur de *Gnrhr* qui facilite leur identification parmi les autres cellules de l'hypophyse et leur subséquente isolation (179). Dans le cadre de cette étude, nous n'avons pas été en mesure de croiser (au début du projet) notre modèle de souris avec l'un des modèles transgéniques décrit ci-haut afin d'étiqueter les cellules gonadotropes, nous mettant dans l'impossibilité d'isoler les gonadotropes pour des cultures. Si nous avions pu utiliser cette méthode, nos résultats auraient possiblement été davantage significatifs, car nous nous serions débarrassés de l'interférence des autres cellules de l'hypophyse. Par exemple, les cellules thyrotropes peuvent également synthétiser CGA, une composante importante de la FSH et la LH. Auraient-elles pu masquer un lien entre YAP/TAZ et CGA dans les cellules gonadotropes?

Outre les cultures primaires mentionnées ci-dessus, il existe deux principales lignées cellulaires immortalisées murines d'origine hypophysaire utilisées afin d'étudier les cellules gonadotropes. L'arrivée de ces cellules il y a une trentaine d'années a favorisé la recherche sur les mécanismes moléculaires sous-jacent à la sécrétion des gonadotrophines. Ces cellules sont dérivées de cellules embryonnaires transformées. Les cellules  $\alpha$ -T3 représentent des gonadotropes à un stade relativement précoce de développement. Ces cellules peuvent exprimer plusieurs gènes spécifiquement associés aux gonadotropes, telles que *Gnrhr*, *Sfl* et *Cga*, mais elles n'expriment pas *Fshb* et *Lhb* (180). Elles sont principalement utilisées pour étudier les mécanismes de signalisation précoce de l'activation de GnRHR, et la régulation de *Cga* et *Lhb*. Les cellules L $\beta$ T2 sont une lignée de cellules gonadotropes plus matures. Elles expriment non seulement les mêmes protéines que les  $\alpha$ -T3, mais également *Lhb* de façon basale et sécrètent la LH lorsque stimulée avec GnRH (181). Aussi, elles peuvent exprimer *Fshb* lorsque stimulées avec les activines (182,183). C'est principalement cette lignée qui est utilisée dans la recherche des mécanismes moléculaires contrôlant la sécrétion des gonadotrophines. Comme nos résultats *in vivo* ont indiqué un phénotype lié à la LH, nous avons décidé d'exploiter à la fois des cultures primaires de cellules d'hypophyse isolées à partir de souris mutantes versus témoins, et une série de cultures utilisant des cellules L $\beta$ T2. Ces dernières nous ont permis de nous affranchir de l'influence physiologique des autres types cellulaires de l'hypophyse.

### **3.2 Approche *in vivo* : système Cre-Lox**

Le ciblage génique conditionnel est un autre outil largement utilisé pour étudier la sécrétion des gonadotrophines. Ces modèles sont basés sur le système Cre-Lox. Une recombinaise Cre, découverte initialement chez des bactériophages P1, est une enzyme capable de reconnaître des séquences génomiques spécifiques appelées les sites Lox P et de les exciser (184). Le système est réalisé en deux étapes. Il faut d'abord insérer de part et d'autre de l'ADN codant pour un gène cible des sites Lox P. Ensuite, il faut faire exprimer l'enzyme recombinaise Cre par le promoteur d'un gène exprimé spécifiquement dans la cellule où l'on souhaite occasionner la délétion du gène cible (185). Ce principe général permet de créer des souris mutantes qui par exemple n'expriment pas *Fshb*, *Lhb*, *Cga* et *Gnrhr*. Ces modèles peuvent également servir à étudier de façon spécifique la fonction de gènes exprimés dans plusieurs types cellulaires dans un type cellulaire en particulier.

Le système Cre-Lox est l'approche que nous avons utilisée dans notre étude. Notre modèle de souris dit  $Yap^{flox/flox}$  ;  $Taz^{flox/flox}$  avait des sites Lox P de part et d'autre des gènes  $Yap/Taz$ , tandis que le modèle  $Gnrhr^{(Gric/+)}$  exprime la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur de  $Gnrhr$ , retrouvé spécifiquement dans les cellules gonadotropes de l'hypophyse. Le croisement entre ces deux souris nous a permis d'obtenir une souris qui a subi la délétion conditionnelle de  $Yap/Taz$  uniquement dans les cellules gonadotropes (Figure 13).



**Figure 13.** Utilisation du ciblage génique conditionnel (Cre-Lox) pour la création d'un modèle murin avec la délétion de  $Yap/Taz$  spécifiquement dans les cellules gonadotropes (Figure originale).

Le modèle  $Yap^{(flox/flox)};Taz^{(flox/flox)};Gnrhr^{(Gric/+)}$  est un excellent modèle pour étudier le rôle de YAP/TAZ spécifiquement dans l'hypophyse car le GnRHR est exprimé uniquement par les cellules gonadotropes. Toutefois, comme le GnRHR est exprimé dès le développement embryonnaire (e13) (39,186), il est possible que la délétion de  $Yap/Taz$  ait eu un effet sur la prolifération et la fonction des cellules gonadotropes. L'hypophyse de notre modèle était-elle pourvue d'un nombre réduit de cellules gonadotropes? Ces cellules avaient-elles une fonction altérée? Afin de vérifier cette hypothèse, nous aurions pu quantifier les cellules exprimant LH $\beta$ , YAP et TAZ marquées par immunofluorescence et comparer leur nombre entre les souris contrôles

et les souris mutantes. Cependant, comme l'apparence histologique des coupes d'hypophyses, les poids des hypophyses et le nombre de cellules obtenus lors des cultures étaient semblables entre les mutants et les contrôles, nous avons considéré empiriquement que le développement n'avait pas été affecté chez nos mutants. Ce compte n'a donc pas été effectué. En théorie, l'influence du système Cre-Lox au niveau du développement peut être évitée en mettant le Cre sous le contrôle d'un gène exprimé tard dans le développement ou directement au stade de développement que l'on souhaite étudier. En pratique, un tel gène n'est pas toujours disponible. L'utilisation d'un modèle de souris avec une Cre inducible est la technique de choix pour inactiver l'expression de gènes à l'âge adulte. Les gènes sont inactivés au moment de l'induction de la recombinaison Cre par injection de tamoxifène. Ce modèle, le iGRIC, a été utilisé avec succès par un groupe de chercheurs qui cherchait à différencier l'influence de la délétion de certain gène lors du développement et à l'âge adulte (123).

Une autre limite de l'étude liée au modèle murin est de ne pas avoir mesuré la diminution de l'expression de YAP et TAZ de manière quantitative dans les hypophyses des contrôles et des mutants. Afin de vérifier plus précisément notre efficacité de recombinaison, nous aurions pu purifier et mettre en culture uniquement les cellules gonadotropes de nos modèles (en utilisant l'une des techniques décrites précédemment) et mesurer l'ARN de *Yap/Taz* par PCR quantitative. Nous aurions également pu compter les cellules exprimant LH $\beta$ -YAP, LH $\beta$ -TAZ en faisant des doubles immunofluorescences directement sur les cellules en culture. Finalement, nous aurions pu mesurer la quantité de protéines YAP/TAZ par Western Blot et immunofluorescence à partir des mêmes cellules.

#### **4. Résultats attendus, inattendus et « énigmes » identifiées dans le projet**

Nos premières expériences ont été réalisées en utilisant le ciblage génique conditionnel, afin de vérifier l'effet *in vivo* de la délétion de *Yap/Taz* sur la synthèse des gonadotrophines. La diminution de l'expression de *Yap/Taz* dans les cellules gonadotropes a entraîné des changements relatifs aux phénotypes des mâles et des femelles, c'est-à-dire une augmentation des paramètres de fertilité en lien avec l'action des gonadotrophines. Effectivement, les taux de la FSH et la LH sanguins étaient augmentés chez les mâles tandis que seule la LH était augmentée chez les femelles. Considérant les liens possibles entre les TGF $\beta$  et la voie Hippo (171,187), et le rôle bien décrit du

complexe SMAD2/3/4 en association avec FOXL2 pour promouvoir l'expression de *Fshb* (121), notre hypothèse initiale était que la diminution de l'expression de *Yap* et *Taz* dans les cellules gonadotropes entraînerait une augmentation l'expression de *Fshb*, et par conséquent une augmentation de la sécrétion de la FSH. De façon surprenante, aucun des gènes responsables de la synthèse des gonadotrophines, soit *Cga*, *Gnrhr*, *Fshb* et *Lhb*, n'ont augmenté dans l'hypophyse de manière significative, tant chez les mâles que chez les femelles. Ces résultats nous indiquent que l'augmentation de la sécrétion des gonadotrophines (particulièrement la LH) par l'hypophyse causée par la délétion de *Yap/Taz* dans les cellules gonadotropes semble indépendante de l'expression génique. D'une certaine manière, ne pas confirmer notre hypothèse initiale représentait la première énigme de notre étude. Si la voie Hippo est liée à la production de gonadotrophines, mais sans modifier l'expression génique des gènes clés, quel serait alors le mécanisme putatif ?

La disparité de résultats par rapport à la sécrétion de la FSH et la LH entre les femelles et les mâles a donc représenté la deuxième énigme de cette étude. Tout d'abord, nous avons initialement pensé l'attribuer à la différence de recombinaison chez les mâles comparativement aux femelles, c'est-à-dire l'expression de *Yap/Taz* n'étant pas diminuée dans la même mesure (i.e. avec une efficacité légèrement supérieure chez les mâles). Nous avons vérifié l'efficacité de la recombinaison en observant directement les protéines sur des coupes d'hypophyses grâce à l'immunofluorescence avec des anticorps contre LHB $\beta$  et TAZ, cependant sans faire de quantification systématique. Il y avait une diminution significative de l'expression de TAZ dans les hypophyses antérieures des souris mutantes, mais pas sa disparition totale. De plus, comme l'expression totale de YAP était en général très faible par rapport à TAZ (publication précédente (168) et quelques tests préliminaires dans notre laboratoire), nous n'avons pas vérifié systématiquement si la recombinaison pour YAP était aussi efficace. Comme ces deux effecteurs peuvent exercer des rôles physiologiques redondants, les concentrations résiduelles de YAP pourraient compenser la suppression des niveaux de protéines TAZ. En définitive, il est possible que la recombinaison de notre modèle murin n'ait pas été optimale. Il s'agit d'une des limites du ciblage génique conditionnel : la délétion de gènes cibles est rarement complètement efficace dans ce type de modèle. D'autre part, la différence de sécrétion des gonadotrophines entre les mâles et les femelles peut provenir d'un dimorphisme sexuel. Il existe effectivement un dimorphisme sexuel pour ce qui a trait au rôle des gonadotrophines dans la fertilité bien décrit dans la littérature. Les

mécanismes de rétrocontrôles de l'axe HHG par les hormones stéroïdiennes diffèrent en raison de la testostérone chez les mâles et la capacité de l'œstrogène d'exercer un rétrocontrôle positif chez les femelles versus négatif chez les mâles (188-190). Ensuite, un autre type de dimorphisme sexuel provient de la différence de la plasticité des cellules de l'hypophyse. Il existe des cellules dans l'hypophyse capable d'entreposer et de sécréter deux hormones différentes ou qui peuvent répondre à deux signaux différents provenant de l'hypothalamus. Il s'agit de cellules matures qui peuvent changer de phénotype par transdifférenciation suite à des stimulations hormonales (191,192). Par exemple, certaines cellules de l'hypophyse murine peuvent sécréter à la fois la prolactine et les gonadotrophines (193). Les hypophyses des femelles possèdent davantage de cellules polyhormonales que les mâles, indiquant un plus haut taux de plasticité (194). Toutefois, dans notre étude, les phénotypes des mâles (augmentation de la testostérone) et des femelles (augmentation du taux d'ovulation sans changement du nombre de follicules) pouvaient logiquement s'expliquer par une augmentation de la sécrétion de la LH, retrouvée de manière constante chez les deux sexes.

En effet, les principaux résultats des expériences *in vivo* nous avaient permis de déterminer que les effecteurs Hippo jouent un rôle clé dans la sécrétion de la LH plutôt que synthèse/sécrétion de la FSH. Pour mieux explorer cette possibilité, nous avons ensuite effectué une culture primaire avec des cellules hypophysaires de souris mutantes (cKO) et leurs contrôles respectifs. Les résultats des expériences *in vitro* suivantes ont effectivement appuyé la présence d'un dimorphisme sexuel dans la régulation des gonadotrophines plutôt qu'un problème associé au processus de recombinaison du modèle, car bien que le phénotype fût présent chez les deux sexes, il était plus marqué chez les femelles. Comme prévu, en raison du phénotype *in vivo*, les résultats ont confirmé que les cellules traitées à la GnRH provenant de mutants sécrétaient plus de LH que les contrôles pour les deux sexes, avec toutefois davantage de changements significatifs chez les femelles. Cependant, ces cultures primaires étaient constituées de toutes les cellules présentes dans l'hypophyse, ce qui aurait pu influencer les cellules gonadotropes par l'action paracrine de facteurs impliqués dans la synthèse des gonadotrophines exprimés par d'autres types de cellules. Pour minimiser cela et pour mieux élucider le mécanisme d'action potentiel par lequel YAP/TAZ supprimaient la synthèse des gonadotrophines, nous avons alors décidé d'utiliser une lignée cellulaire murine immortalisée.



Nous avons mentionné précédemment que les cellules gonadotropes immortalisées matures (L $\beta$ T2) offrent une alternative intéressante afin d'étudier les mécanismes en amont de la sécrétion des gonadotrophines, et ce sans l'interférence des autres cellules de l'hypophyse et des gonades telle qu'exercée *in vivo*. Ce sont des cellules qui peuvent exprimer *Fshb*, *Lhb*, *Gnrhr* et *Cga*, et répondre aux activines et à la GnRH (181-183). Donc, nous avons mis ces cellules en culture, prétraitées avec la vertéporfine (VP), une molécule pharmaceutique qui bloque la liaison entre YAP/TAZ et les facteurs de transcription de la famille TEAD (195-197) et nous avons ensuite stimulé ces cellules avec la GnRH. Bloquer l'interaction de YAP/TAZ avec TEAD a eu pour résultat d'augmenter la sécrétion de la LH basale et induite par la GnRH dans le milieu de culture, résultat semblable à ceux obtenus avec la culture primaire de cellules d'hypophyse de notre modèle murin. À l'instar de cette culture, l'augmentation de la LH ne s'est pas reflétée dans l'expression génique de *Lhb*. Ces résultats ont de nouveau confirmé que l'effet inhibiteur de YAP/TAZ sur la sécrétion de la LH semble indépendant de l'expression génique de *Lhb*. Toutefois, cette expérience a apporté un nouvel élément à l'explication mécaniste : la frontière entre YAP/TAZ et TEADs.

Finalement, l'augmentation de la LH indépendante de l'expression génique soulève le mystère principal de cette étude. Le mécanisme cellulaire précis qui implique YAP/TAZ dans la synthèse des gonadotrophines (et qui expliquent clairement le phénotype manifesté) n'est pas élucidé à ce jour. Bien que la sécrétion de la LH soit directement liée à l'expression de *Lhb* stimulé par l'action de la GnRH et que cette régulation passant par les facteurs de transcription SF1, PITX1, EGR1 soit bien décrite dans la littérature (99,198,199), elle passe également par d'autres mécanismes en aval du signal génique. L'assemblage des sous-unités (LH $\beta$  et CGA) et le transport de la LH vers l'extérieur de la cellule gonadotrope et dans la circulation sanguine périphérique représentent tous autant de mécanismes dans lesquels YAP/TAZ pourraient être impliqués. L'exocytose des vésicules sécrétrices exige une plasticité morphologique qui implique le cytosquelette d'actine. La GnRH active le réseau d'actine, facilitant l'exocytose des granules de LH non seulement à partir des cellules gonadotropes, mais également les aidant à développer des processus les permettant de s'étendre en direction des vaisseaux sanguins (200). Conséquemment, dérégler le remodelage du réseau d'actine dans les gonadotropes murines bloque la sécrétion de la LH (201). De manière intéressante, la régulation de la voie Hippo dépend en grande partie de

signaux mécaniques et architecturaux cellulaires (contact, jonction, polarité et matrice cellulaire) qui impliquent le cytosquelette d'actine (202).

La prochaine étape sera d'identifier quels facteurs précis en aval de la transcription génique de *Lhb* et, principalement, en amont de la sécrétion de la LH sont contrôlés par YAP/TAZ. Les granules de sécrétion des cellules gonadotropes offrent une avenue intéressante à explorer. Ces granules contiennent des protéines cargo (granines), qui semblent voyager préférentiellement avec l'une ou l'autre des gonadotrophines (47). La sécrétogranine SgII semble même exercer une influence sur la régulation de la sécrétion de la LH en induisant son agrégation et facilitant ainsi son transport dans les granules de sécrétion (203). YAP/TAZ seraient-ils impliqués dans le mécanisme d'exocytose des granules contenant la LH ? Les effecteurs de la voie Hippo pourraient-ils réguler la synthèse et / ou fonction des sécrétogranines ? Ensuite, la plasticité morphologique manifestée par les cellules gonadotropes à la suite de stimulations de GnRH représente également un aspect à investiguer davantage. La GnRH stimule le cytosquelette d'actine et concentre LH $\beta$  dans des aires de remodelage dynamique de la membrane des cellules gonadotropes, favorisant l'exocytose de la LH (204). Considérant l'étroite relation entre la voie Hippo et les signaux architecturaux cellulaires, il est possible que YAP/TAZ jouent un rôle dans cette réponse morphologique. Quels sont donc les liens possibles entre YAP/TAZ et le cytosquelette d'actine ?

Très probablement, la prochaine étape la plus logique consiste à vérifier le lien entre la synthèse des sécrétogranines et Hippo. Pour ça, nous allons utiliser les cellules L $\beta$ T2 traitées avec VP (voir Figure 5 de l'article) afin de mesurer la quantité d'ARN de *SgII* et *Cga* par PCR quantitative ainsi que l'expression protéique à l'aide des anticorps décrits par Nicol et ses collaborateurs (203). Ensuite, afin de tester l'implication de YAP/TAZ dans le processus d'exocytose de LH, nous allons tenter de quantifier l'expression génique de plusieurs facteurs impliqués dans l'exocytose des vésicules, tels que la cortactine, la dynamine, l'actine (201,205). Finalement, nous allons lier à ces protéines des anticorps couplés à des molécules fluorescentes afin d'observer leur localisation cellulaire (cytoplasmique) précise. Si les résultats s'avèrent intéressants, nous pourrions effectuer les mêmes expériences sur les cellules d'hypophyse provenant de nos souris cKO et contrôles pour confirmer ces résultats *in vitro* dans notre modèle *in vivo*.

## Chapitre 5. Conclusions

En conclusion, les effecteurs finaux de la voie Hippo, soit YAP et TAZ, exercent un rôle suppresseur de la sécrétion des gonadotrophines, plus particulièrement celle de la LH. Il s'agit de la première étude qui démontre un rôle fonctionnel de la voie Hippo dans l'hypophyse antérieure, plus spécifiquement dans les cellules gonadotropes.

En induisant la délétion de *Yap/Taz* spécifiquement dans les cellules gonadotropes à l'aide du ciblage génique conditionnel, nous avons créé une lignée de souris mâles et femelles qui présentaient des changements hormonaux et morphologiques compatibles avec une augmentation de sécrétion des gonadotrophines, notamment un phénotype d'hyperfertilité chez les femelles relié à une augmentation de la LH. Afin de confirmer le rôle de YAP/TAZ dans ce phénotype, nous avons traité les cellules d'hypophyses provenant de notre modèle murin mises en culture avec de la GnRH et observé une augmentation de la sécrétion de la LH. Finalement, afin de nous affranchir de l'influence paracrine des autres cellules de l'hypophyse, nous avons prétraité des cellules LBT2, cellules gonadotropes immortalisées, avec de la vertéporfine (VP), un inhibiteur de l'interaction de YAP/TAZ avec TEAD, et observé de nouveau une augmentation de la sécrétion de la LH suite à un traitement de GnRH.

Ensemble, nos résultats établissent une preuve du rôle suppresseur de la voie Hippo dans la sécrétion de la LH. Ces résultats représentent une avancée importante quant à la compréhension des facteurs impliqués dans la production des gonadotrophines, bien que le mécanisme moléculaire précis de libération ne soit toujours pas élucidé. Toutefois, la connaissance du rôle fonctionnel de YAP/TAZ dans la synthèse de la LH ouvre la voie au développement de molécules pharmaceutiques dans la quête du contrôle ou de l'amélioration de la fertilité chez les mammifères.

## Chapitre 6. Bibliographie

1. Drouin J. Pituitary Development. *The Pituitary* 2017;3-22.
2. Hong GK, Payne SC, Jane JA, Jr. Anatomy, Physiology, and Laboratory Evaluation of the Pituitary Gland. *Otolaryngologic Clinic of North America*. 2016;49(1):21-32.
3. Takuma N, Sheng HZ, Furuta Y, Ward JM, Sharma K, Hogan BLM, Pfaff SL, Westphal H, Kimura S, Mahon KA. Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. *Development*. 1998;125(23):4835-4840.
4. Ohuchi H, Hori Y, Yamasaki M, Harada H, Sekine K, Kato S, Itoh N. FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000;277(3):643-649.
5. Osmundsen AM, Keisler JL, Taketo MM, Davis SW. Canonical WNT Signaling Regulates the Pituitary Organizer and Pituitary Gland Formation. *Endocrinology*. 2017;158(10):3339-3353.
6. Kawamura K, Kouki T, Kawahara G, Kikuyama S. Hypophyseal development in vertebrates from amphibians to mammals. *General and Comparative Endocrinology*. 2002;126(2):130-135.
7. Kelberman D, Rizzoti K, Lovell-Badge R, Robinson IC, Dattani MT. Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse. *Endocrinology Reviews*. 2009;30(7):790-829.
8. Yeung CM, Chan CB, Leung PS, Cheng CH. Cells of the anterior pituitary. *International Journal of Biochemistry and Cellular Biology*. 2006;38(9):1441-1449.
9. Stricker EM, Verbalis, J. G. Interaction of osmotic and volume stimuli in regulation of neurohypophyseal secretion in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*,. 1986;250(2):R267-R275.
10. Crowley WR, & Armstrong, W. E. Neurochemical Regulation of Oxytocin Secretion in Lactation. *Endocrine reviews*. 1992;13(1):33-65.
11. Ben-Shlomo A, Melmed S. Hypothalamic Regulation of Anterior Pituitary Function. *The Pituitary*. 2017:23-45.
12. Levy A. Physiological implications of pituitary trophic activity. *Journal of Endocrinology*. 2002;174(2):147-155.

13. Inoue K, Tanaka S, Kurosumi K. Mitotic activity of gonadotropes in the anterior pituitary of the castrated male rat. *Cell and Tissue Research*. 1985;240(2):271-276.
14. Fekete C, Lechan RM. Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing neurons: role of neuronal afferents and type 2 deiodinase. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2007;28(2-3):97-114.
15. Gershengorn MC. Mechanism of thyrotropin-releasing hormone stimulation of pituitary hormone secretion. *Annual Review of Physiology*. 1986;48(1):525-526.
16. Yamada M, Shibusawa N, Ishii S, Horiguchi K, Umezawa R, Hashimoto K, Monden T, Satoh T, Hirato J, Mori M. Prolactin secretion in mice with thyrotropin-releasing hormone deficiency. *Endocrinology*. 2006;147(5):2591-2596.
17. Romanò N, Michael JS. Anterior Pituitary and Pars Intermedia Space. Hormonal Signaling in Biology and Medicine. 2020:145-169.
18. Mayo KE, Miller, T., DeAlmeida, V., Godfrey, P., Zheng, J., & Cunha, S. R. Regulation of the pituitary somatotroph cell by GHRH and its receptor. *Recent progress in hormone research*. 2000;55:237-268.
19. Lin SC, Lin, C. R., Gukovsky, I., Lusic, A. J., Sawchenko, P. E., & Rosenfeld, M. G. Molecular basis of the little mouse phenotype and implications for cell type-specific growth. *Nature*. 1993;364(6436):208-213.
20. Li H, Zeitler, P. S., Valerius, M. T., Small, K., & Potter, S. S. Gsh-1, an orphan Hox gene, is required for normal pituitary development. *The EMBO Journal*. 1996;15(4):714-724.
21. Godfrey P, Rahal, J. O., Beamer, W. G., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Mayo, K. E. . GHRH receptor of little mice contains a missense mutation in the extracellular domain that disrupts receptor function. *Nature genetics*. 1993;4(3):227-232.
22. Bernard DJ, Tran S. Mechanisms of activin-stimulated FSH synthesis: the story of a pig and a FOX. *Biology of Reproduction*. 2013;88(3):78.
23. Savoy-Moore RT, Swartz KH. Several GnRH stimulation frequencies differentially release FSH and LH from isolated, perfused rat anterior pituitary cells. *Advances in Experimental Medecine and Biology*. 1987;219:641-645.
24. Wildt L, Hausler A, Marshall G, Hutchison JS, Plant TM, Belchetz PE, Knobil E. Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology*. 1981;109(2):376-385.

25. Roch GJ, Busby ER, Sherwood NM. Evolution of GnRH: diving deeper. *General and Comparative Endocrinology*. 2011;171(1):1-16.
26. Schally AV, Arimura, A., Baba, Y., Nair, R. M. G., Matsuo, H., Redding, T. W., ... & White, W. F. . Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochemical and biophysical research communications*. 1971;43(2):393-399.
27. Sarkar DK, Chiappa, S. A., Fink, G., & Sherwood, N. M. Gonadotropin-releasing hormone surge in pro-oestrous rats. *Nature*. 1976;264(5585):461-463.
28. Stojilkovic SS, John Reinhart, and Kevin J. Catt. Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors- Structure and Signal Transduction Pathways. *Endocrine reviews*. 1994;15(4):462-499.
29. Grosse R, Schmid, A., Schöneberg, T., Herrlich, A., Muhn, P., Schultz, G., & Gudermann, T. (Gonadotropin-releasing Hormone Receptor Initiates Multiple Signaling Pathways by Exclusively Coupling to Gq:11Proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(13):9193-9200.
30. Cheng KW, Parimal S. Nathwani, and Peter CK Leung. Regulation of human gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in placental cells. *Endocrinology*. 2000;141(7):2340-2349.
31. Kaprara A, Huhtaniemi IT. The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men. *Metabolism*. 2018;86:3-17.
32. Kraus S, Zvi Naor, and Rony Seger. Intracellular Signaling Pathways Mediated by the Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Receptor. *Archives of medical research*. 2001;32(6):499-509.
33. Ferris HA, Shupnik MA. Mechanisms for pulsatile regulation of the gonadotropin subunit genes by GNRH1. *Biology of Reproduction*. 2006;74(6):993-998.
34. Thompson IR, Kaiser UB. GnRH pulse frequency-dependent differential regulation of LH and FSH gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2014;385(1-2):28-35.
35. Vizcarra JA, Wettemann RP, Braden TD, Turzillo AM, Nett TM. Effect of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on serum and pituitary concentrations of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone, GnRH receptors, and messenger ribonucleic acid for gonadotropin subunits in cows. *Endocrinology*. 1997;138(2):594-601.
36. Millar RP. GnRHs and GnRH receptors. *Animal Reproduction Science*. 2005;88(1-2):5-28.

37. Cheung LW, Wong AS. Gonadotropin-releasing hormone: GnRH receptor signaling in extrapituitary tissues. *FEBS Journal*. 2008;275(22):5479-5495.
38. Aguilar-Rojas A, Huerta-Reyes M. Human gonadotropin-releasing hormone receptor-activated cellular functions and signaling pathways in extra-pituitary tissues and cancer cells (Review). *Oncology Reports*. 2009;22(5):981-990.
39. Wen S, Ai W, Alim Z, Boehm U. Embryonic gonadotropin-releasing hormone signaling is necessary for maturation of the male reproductive axis. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 2010;107(37):16372-16377.
40. Wu S, Wilson MD, Busby ER, Isaac ER, Sherwood NM. Disruption of the single copy gonadotropin-releasing hormone receptor in mice by gene trap: severe reduction of reproductive organs and functions in developing and adult mice. *Endocrinology*. 2010;151(3):1142-1152.
41. Tsutsumi R, Webster NJ. GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction. *Endocrinology Journal*. 2009;56(6):729-737.
42. Hall JE, Brodie TD, Badger TM, Rivier J, Vale W, Conn PM, Schoenfeld D, Crowley WF. Evidence of Differential Control of Fsh and Lh-Secretion by Gonadotropin-Releasing Hormone (Gnrh) from the Use of a Gnrh Antagonist. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1988;67(3):524-531.
43. DePaolo LV, Bald LN, Fendly BM. Passive immunoneutralization with a monoclonal antibody reveals a role for endogenous activin-B in mediating FSH hypersecretion during estrus and following ovariectomy of hypophysectomized, pituitary-grafted rats. *Endocrinology*. 1992;130(3):1741-1743.
44. Farnworth PG. Gonadotropin-Secretion Revisited - How Many Ways Can Fsh Leave a Gonadotroph. *Journal of Endocrinology*. 1995;145(3):387-395.
45. Padmanabhan V, McNeilly AS. Is there an FSH-releasing factor? *Reproduction*. 2001;121(1):21-30.
46. Weiss J, Duca KA, Crowley WF, Jr. Gonadotropin-releasing hormone-induced stimulation and desensitization of free alpha-subunit secretion mirrors luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in perfused rat pituitary cells. *Endocrinology*. 1990;127(5):2364-2371.

47. Watanabe T, Banno T, Jeziorowski T, Ohsawa Y, Waguri S, Grube D, Uchiyama Y. Effects of sex steroids on secretory granule formation in gonadotropes of castrated male rats with respect to granin expression. *Endocrinology*. 1998;139(6):2765-2773.
48. Nicol L, McNeilly JR, Stridsberg M, McNeilly AS. Differential secretion of gonadotrophins: investigation of the role of secretogranin II and chromogranin A in the release of LH and FSH in LbetaT2 cells. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2004;32(2):467-480.
49. Thomas SG, Clarke IJ. The positive feedback action of estrogen mobilizes LH-containing, but not FSH-containing secretory granules in ovine gonadotropes. *Endocrinology*. 1997;138(3):1347-1350.
50. McNeilly AS, Crawford, J. L., Taragnat, C., Nicol, L., & McNeilly, J. R. . The differential secretion of FSH and LH- regulation through genes, feedback and packaging. *Reproduction (Cambridge). T*. 2003:463-476.
51. Markkula M, Kananen K, Klemi P, Huhtaniemi I. Pituitary and ovarian expression of the endogenous follicle-stimulating hormone (FSH) subunit genes and an FSH beta-subunit promoter-driven herpes simplex virus thymidine kinase gene in transgenic mice; specific partial ablation of FSH-producing cells by antiherpes treatment. *Journal of Endocrinology*. 1996;150(2):265-273.
52. Markkula M, Hamalainen T, Loune E, Huhtaniemi I. The follicle-stimulating hormone (FSH) beta- and common alpha-subunits are expressed in mouse testis, as determined in wild-type mice and those transgenic for the FSH beta-subunit/herpes simplex virus thymidine kinase fusion gene. *Endocrinology*. 1995;136(11):4769-4775.
53. Mandrekar PS, Sheth AR, Doctor VM, Zaveri JP, Sheth NA. Immunocytochemical localization of follicle stimulating hormone in normal human stomach. *Anatomical Record*. 1990;227(3):334-339.
54. Dirnhofer S, Berger C, Hermann M, Steiner G, Madersbacher S, Berger P. Coexpression of gonadotropic hormones and their corresponding FSH- and LH/CG-receptors in the human prostate. *Prostate*. 1998;35(3):212-220.
55. Stelmaszewska J, Chrusciel M, Doroszko M, Akerfelt M, Ponikwicka-Tyszko D, Nees M, Frentsch M, Li X, Kero J, Huhtaniemi I, Wolczynski S, Rahman NA. Revisiting the



- expression and function of follicle-stimulation hormone receptor in human umbilical vein endothelial cells. *Sci Rep*. 2016;6:37095.
56. Jayaraman A, Kumar TR. Extra-pituitary expressed follicle-stimulating hormone: Is it physiologically important? *Biology of Reproduction*. 2017;97(4):622-626.
  57. Haywood M, Spaliviero J, Jimenez M, King NJ, Handelsman DJ, Allan CM. Sertoli and germ cell development in hypogonadal (hpg) mice expressing transgenic follicle-stimulating hormone alone or in combination with testosterone. *Endocrinology*. 2003;144(2):509-517.
  58. O'Shaughnessy PJ, Monteiro A, Verhoeven G, De Gendt K, Abel MH. Effect of FSH on testicular morphology and spermatogenesis in gonadotrophin-deficient hypogonadal mice lacking androgen receptors. *Reproduction*. 2010;139(1):177-184.
  59. McLachlan RI, Wreford NG, de Kretser DM, Robertson DM. The effects of recombinant follicle-stimulating hormone on the restoration of spermatogenesis in the gonadotropin-releasing hormone-immunized adult rat. *Endocrinology*. 1995;136(9):4035-4043.
  60. Kumar T, Wang Y, Lu N, Matzuk M. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature Genetics*. 1997;15:201-204.
  61. Bicsak TA, Vale W, Vaughan J, Tucker EM, Cappel S, Hsueh AJ. Hormonal regulation of inhibin production by cultured Sertoli cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1987;49(2-3):211-217.
  62. Halpin DM, Charlton HM. Effects of short-term injection of gonadotrophins on ovarian follicle development in hypogonadal (hpg) mice. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1988;82(1):393-400.
  63. Van Cappellen WA, Meijs-Roelofs HM, Kramer P, Van den Dungen HM. Ovarian follicle dynamics in immature rats treated with a luteinizing hormone-releasing hormone antagonist (Org. 30276). *Biology of Reproduction*. 1989;40(6):1247-1256.
  64. McGee EA, Perlas E, LaPolta PS, Tsafiriri A, Hsueh AJ. Follicle-stimulating hormone enhances the development of preantral follicles in juvenile rats. *Biology of Reproduction*. 1997;57(5):990-998.
  65. Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocrinology Reviews*. 1997;18(6):739-773.

66. Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. *Journal of Clinical Investigation*. 2010;120(4):963-972.
67. Lizneva D, Rahimova A, Kim SM, Atabiekov I, Javaid S, Alamoush B, Taneja C, Khan A, Sun L, Azziz R, Yuen T, Zaidi M. FSH Beyond Fertility. *Frontiers of Endocrinology (Lausanne)*. 2019;10:136.
68. Chang C, Chen YT, Yeh SD, Xu Q, Wang RS, Guillou F, Lardy H, Yeh S. Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 2004;101(18):6876-6881.
69. Ramaswamy S, Weinbauer GF. Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. *Spermatogenesis*. 2014;4(2):e996025.
70. Kishi H, Kitahara Y, Imai F, Nakao K, Suwa H. Expression of the gonadotropin receptors during follicular development. *Reproductive Medicine and Biology*. 2018;17(1):11-19.
71. Gervasio CG, Bernuci MP, Silva-de-Sa MF, Rosa ESAC. The role of androgen hormones in early follicular development. *ISRN Obstetrics and Gynecology*. 2014;2014:818010.
72. Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *Journal of Reproduction and Development*. 2012;58(1):44-50.
73. Richards JS, Russell DL, Robker RL, Dajee M, Alliston TN. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1998;145(1-2):47-54.
74. Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiology Reviews*. 2000;80(1):1-29.
75. Orisaka M, Tajima K, Tsang BK, Kotsuji F. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *Journal of Ovarian Research*. 2009;2(1):9.
76. Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA, Chin WW. Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocrinology Reviews*. 1990;11(1):177-199.
77. Clarke IJ. Control of GnRH secretion: one step back. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2011;32(3):367-375.

78. Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *Journal of Neuroscience*. 2006;26(25):6687-6694.
79. Burgess LH, Handa RJ. Hormonal regulation of androgen receptor mRNA in the brain and anterior pituitary gland of the male rat. *Brain Research Molecular Brain Research*. 1993;19(1-2):31-38.
80. Scully KM, Gleiberman AS, Lindzey J, Lubahn DB, Korach KS, Rosenfeld MG. Role of estrogen receptor-alpha in the anterior pituitary gland. *Molecular Endocrinology*. 1997;11(6):674-681.
81. Ying SY. Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocrinology Reviews*. 1988;9(2):267-293.
82. Gray PC, Bilezikjian LM, Vale W. Antagonism of activin by inhibin and inhibin receptors: a functional role for betaglycan. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2002;188(1-2):254-260.
83. Kumar TR, Varani S, Wreford NG, Telfer NM, de Kretser DM, Matzuk MM. Male reproductive phenotypes in double mutant mice lacking both FSHbeta and activin receptor IIA. *Endocrinology*. 2001;142(8):3512-3518.
84. Kumar TR. Functional analysis of LHbeta knockout mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2007;269(1-2):81-84.
85. Ma X, Dong Y, Matzuk MM, Kumar TR. Targeted disruption of luteinizing hormone beta-subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2004;101(49):17294-17299.
86. Kendall SK, Gordon DF, Birkmeier TS, Petrey D, Sarapura VD, O'Shea KS, Wood WM, Lloyd RV, Ridgway EC, Camper SA. Enhancer-mediated high level expression of mouse pituitary glycoprotein hormone alpha-subunit transgene in thyrotropes, gonadotropes, and developing pituitary gland. *Molecular Endocrinology*. 1994;8(10):1420-1433.
87. Narayan P, Ulloa-Aguirre A, Dias J. Gonadotropin hormones and their receptors. Eighth edition. ed. Philadelphia, PA: Elsevier.
88. Bernard D, Brûlé E. Anterior Pituitary: Glycoprotein Hormones From Gonadotrope (FSH and LH) and Thyrotrope (TSH) Cells. Waltham: Elsevier.

89. Loumaye E, Catt KJ. Agonist-induced regulation of pituitary receptors for gonadotropin-releasing hormone. Dissociation of receptor recruitment from hormone release in cultured gonadotrophs. *Journal of Biology and Chemistry*. 1983;258(19):12002-12009.
90. Rispoli LA, Nett TM. Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: structure, distribution and regulation of expression. *Animal Reproduction Science*. 2005;88(1-2):57-74.
91. Lee VH, Lee LT, Chow BK. Gonadotropin-releasing hormone: regulation of the GnRH gene. *FEBS Journal*. 2008;275(22):5458-5478.
92. Horn F, Windle JJ, Barnhart KM, Mellon PL. Tissue-Specific Gene-Expression in the Pituitary - the Glycoprotein Hormone Alpha-Subunit Gene Is Regulated by a Gonadotrope-Specific Protein. *Molecular and Cellular Biology*. 1992;12(5):2143-2153.
93. Fox N, Solter D. Expression and regulation of the pituitary- and placenta-specific human glycoprotein hormone alpha-subunit gene is restricted to the pituitary in transgenic mice. *Molecular Cellular Biology*. 1988;8(12):5470-5476.
94. Bliss SP, Miller A, Navratil AM, Xie J, McDonough SP, Fisher PJ, Landreth GE, Roberson MS. ERK signaling in the pituitary is required for female but not male fertility. *Molecular Endocrinology*. 2009;23(7):1092-1101.
95. Kay TW, Jameson JL. Identification of a gonadotropin-releasing hormone-responsive region in the glycoprotein hormone alpha-subunit promoter. *Molecular Endocrinology*. 1992;6(11):1767-1773.
96. Maurer RA, Kim KE, Schoderbek WE, Roberson MS, Glenn DJ. Regulation of glycoprotein hormone alpha-subunit gene expression. *Recent Progress in Hormone Research*. 1999;54:455-484; discussion 485.
97. Jorgensen JS, Quirk CC, Nilson JH. Multiple and overlapping combinatorial codes orchestrate hormonal responsiveness and dictate cell-specific expression of the genes encoding luteinizing hormone. *Endocrinology Reviews*. 2004;25(4):521-542.
98. Dorn C, Ou Q, Svaren J, Crawford PA, Sadovsky Y. Activation of luteinizing hormone beta gene by gonadotropin-releasing hormone requires the synergy of early growth response-1 and steroidogenic factor-1. *Journal of Biology and Chemistry*. 1999;274(20):13870-13876.

99. Tremblay JJ, Drouin J. Egr-1 is a downstream effector of GnRH and synergizes by direct interaction with Ptx1 and SF-1 to enhance luteinizing hormone beta gene transcription. *Molecular and Cellular Biology*. 1999;19(4):2567-2576.
100. Lee SL, Sadovsky Y, Swirnoff AH, Polish JA, Goda P, Gavriline G, Milbrandt J. Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). *Science*. 1996;273(5279):1219-1221.
101. Shinoda K, Lei H, Yoshii H, Nomura M, Nagano M, Shiba H, Sasaki H, Osawa Y, Ninomiya Y, Niwa O, et al. Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Developmental Dynamics*. 1995;204(1):22-29.
102. Ikeda Y, Luo XR, Abbud R, Nilson JH, Parker KL. The Nuclear Receptor Steroidogenic Factor-1 Is Essential for the Formation of the Ventromedial Hypothalamic Nucleus. *Molecular Endocrinology*. 1995;9(4):478-486.
103. Fortin J, Lamba P, Wang Y, Bernard DJ. Conservation of mechanisms mediating gonadotrophin-releasing hormone 1 stimulation of human luteinizing hormone beta subunit transcription. *Molecular Human Reproduction*. 2009;15(2):77-87.
104. Weck J, Fallest PC, Pitt LK, Shupnik MA. Differential gonadotropin-releasing hormone stimulation of rat luteinizing hormone subunit gene transcription by calcium influx and mitogen-activated protein kinase-signaling pathways. *Molecular Endocrinology*. 1998;12(3):451-457.
105. Harris D, Bonfil D, Chuderland D, Kraus S, Seger R, Naor Z. Activation of MAPK cascades by GnRH: ERK and Jun N-terminal kinase are involved in basal and GnRH-stimulated activity of the glycoprotein hormone LHbeta-subunit promoter. *Endocrinology*. 2002;143(3):1018-1025.
106. Stamatiades GA, Kaiser UB. Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2018;463(C):131-141.
107. Fortin J, Bernard DJ. SMAD3 and EGR1 physically and functionally interact in promoter-specific fashion. *Cell Signaling*. 2010;22(6):936-943.
108. Lindzey J, Wetsel WC, Couse JF, Stoker T, Cooper R, Korach KS. Effects of castration and chronic steroid treatments on hypothalamic gonadotropin-releasing hormone content

- and pituitary gonadotropins in male wild-type and estrogen receptor-alpha knockout mice. *Endocrinology*. 1998;139(10):4092-4101.
109. Gieske MC, Kim HJ, Legan SJ, Koo Y, Krust A, Chambon P, Ko C. Pituitary gonadotroph estrogen receptor-alpha is necessary for fertility in females. *Endocrinology*. 2008;149(1):20-27.
  110. Toufaily C, Schang G, Zhou X, Wartenberg P, Boehm U, Lydon JP, Roelfsema F, Bernard DJ. Impaired LH surge amplitude in gonadotrope-specific progesterone receptor knockout mice. *Journal of Endocrinology*. 2020;244(1):111-122.
  111. West BE, Parker GE, Savage JJ, Kiratipranon P, Toomey KS, Beach LR, Colvin SC, Sloop KW, Rhodes SJ. Regulation of the follicle-stimulating hormone beta gene by the LHX3 LIM-homeodomain transcription factor. *Endocrinology*. 2004;145(11):4866-4879.
  112. Bernard DJ, Fortin J, Wang Y, Lamba P. Mechanisms of FSH synthesis: what we know, what we don't, and why you should care. *Fertility and Sterility*. 2010;93(8):2465-2485.
  113. Haisenleder DJ, Burger LL, Walsh HE, Stevens J, Aylor KW, Shupnik MA, Marshall JC. Pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulation of gonadotropin subunit transcription in rat pituitaries: evidence for the involvement of Jun N-terminal kinase but not p38. *Endocrinology*. 2008;149(1):139-145.
  114. Ciccone NA, Lacza CT, Hou MY, Gregory SJ, Kam KY, Xu SY, Kaiser UB. A composite element that binds basic helix loop helix and basic leucine zipper transcription factors is important for gonadotropin-releasing hormone regulation of the follicle-stimulating hormone beta gene. *Molecular Endocrinology*. 2008;22(8):1908-1923.
  115. Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, Guillemin R. Pituitary Fsh Is Released by a Heterodimer of the Beta-Subunits from the 2 Forms of Inhibin. *Nature*. 1986;321(6072):779-782.
  116. Rivier J, Spiess J, Mcclintock R, Vaughan J, Vale W. Purification and Partial Characterization of Inhibin from Porcine Follicular-Fluid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1985;133(1):120-127.
  117. Abe Y, Minegishi T, Leung PC. Activin receptor signaling. *Growth Factors*. 2004;22(2):105-110.

118. Fortin J, Ongaro L, Li Y, Tran S, Lamba P, Wang Y, Zhou X, Bernard DJ. Minireview: Activin Signaling in Gonadotropes: What Does the FOX say... to the SMAD? *Molecular Endocrinology*. 2015;29(7):963-977.
119. Suszko MI, Lo DJ, Suh H, Camper SA, Woodruff TK. Regulation of the rat follicle-stimulating hormone beta-subunit promoter by activin. *Molecular Endocrinology*. 2003;17(3):318-332.
120. Bernard DJ. Both SMAD2 and SMAD3 mediate activin-stimulated expression of the follicle-stimulating hormone beta subunit in mouse gonadotrope cells. *Molecular Endocrinology*. 2004;18(3):606-623.
121. Tran S, Lamba P, Wang Y, Bernard DJ. SMADs and FOXL2 synergistically regulate murine FSHbeta transcription via a conserved proximal promoter element. *Molecular Endocrinology*. 2011;25(7):1170-1183.
122. Lamba P, Fortin J, Tran S, Wang Y, Bernard DJ. A Novel Role for the Forkhead Transcription Factor FOXL2 in Activin A-Regulated Follicle-Stimulating Hormone beta Subunit Transcription. *Molecular Endocrinology*. 2009;23(7):1001-1013.
123. Li Y, Schang G, Wang Y, Zhou X, Levasseur A, Boyer A, Deng CX, Treier M, Boehm U, Boerboom D, Bernard DJ. Conditional Deletion of FOXL2 and SMAD4 in Gonadotropes of Adult Mice Causes Isolated FSH Deficiency. *Endocrinology*. 2018;159(7):2641-2655.
124. Justice RW, Zilian O, Woods DF, Noll M, Bryant PJ. The Drosophila Tumor-Suppressor Gene Warts Encodes a Homolog of Human Myotonic-Dystrophy Kinase and Is Required for the Control of Cell-Shape and Proliferation. *Genes & Development*. 1995;9(5):534-546.
125. Xu T, Wang W, Zhang S, Stewart RA, Yu W. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the Drosophila lats gene encodes a putative protein kinase. *Development*. 1995;121(4):1053-1063.
126. Harvey KF, Pflieger CM, Hariharan IK. The Drosophila Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell*. 2003;114(4):457-467.
127. Tapon N, Harvey KF, Bell DW, Wahrer DCR, Schiripo TA, Haber DA, Hariharan IK. salvador promotes both cell cycle exit and apoptosis in Drosophila and is mutated in human cancer cell lines. *Cell*. 2002;110(4):467-478.

128. Wu S, Huang JB, Dong JX, Pan DJ. hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell*. 2003;114(4):445-456.
129. Lai ZC, Wei XM, Shimizu T, Ramos E, Rohrbaugh M, Nikolaidis N, Ho LL, Li Y. Control of cell proliferation and apoptosis by Mob as tumor suppressor, Mats. *Cell*. 2005;120(5):675-685.
130. Huang J, Wu S, Barrera J, Matthews K, Pan D. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP. *Cell*. 2005;122(3):421-434.
131. Zhao B, Tumaneng K, Guan KL. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat Cell Biology*. 2011;13(8):877-883.
132. Yu FX, Zhao B, Guan KL. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell*. 2015;163(4):811-828.
133. Callus BA, Verhagen AM, Vaux DL. Association of mammalian sterile twenty kinases, Mst1 and Mst2, with hSalvador via C-terminal coiled-coil domains, leads to its stabilization and phosphorylation. *Febs Journal*. 2006;273(18):4264-4276.
134. Chan EH, Nousiainen M, Chalamalasetty RB, Schafer A, Nigg EA, Sillje HHW. The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene*. 2005;24(12):2076-2086.
135. Chow A, Hao Y, Yang X. Molecular characterization of human homologs of yeast MOB1. *International Journal of Cancer*. 2010;126(9):2079-2089.
136. Hao Y, Chun A, Cheung K, Rashidi B, Yang X. Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of oncogene YAP. *Journal of Biology and Chemistry*. 2008;283(9):5496-5509.
137. Koo JH, Guan KL. Interplay between YAP/TAZ and Metabolism. *Cell Metabolism*. 2018;28(2):196-206.
138. Yu FX, Zhao B, Panupinthu N, Jewell JL, Lian I, Wang LH, Zhao JG, Yuan HX, Tumaneng K, Li HR, Fu XD, Mills GB, Guan KL. Regulation of the Hippo-YAP Pathway by G-Protein-Coupled Receptor Signaling. *Cell*. 2012;150(4):780-791.
139. Saito A, Nagase T. Hippo and TGF-beta interplay in the lung field. *American Journal of Physiology- Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2015;309(8):L756-767.



140. Sudol M, Chen HI, Bougeret C, Einbond A, Bork P. Characterization of a novel protein-binding module--the WW domain. *FEBS Letter*. 1995;369(1):67-71.
141. Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, Xie J, Ikenoue T, Yu J, Li L, Zheng P, Ye K, Chinnaiyan A, Halder G, Lai ZC, Guan KL. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Development*. 2007;21(21):2747-2761.
142. Chen YA, Lu CY, Cheng TY, Pan SH, Chen HF, Chang NS. WW Domain-Containing Proteins YAP and TAZ in the Hippo Pathway as Key Regulators in Stemness Maintenance, Tissue Homeostasis, and Tumorigenesis. *Frontiers in Oncology*. 2019;9:60.
143. Kanai F, Marignani PA, Sarbassova D, Yagi R, Hall RA, Donowitz M, Hisaminato A, Fujiwara T, Ito Y, Cantley LC, Yaffe MB. TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *EMBO Journal*. 2000;19(24):6778-6791.
144. Zhao B, Li L, Tumaneng K, Wang CY, Guan KL. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes Development*. 2010;24(1):72-85.
145. Zhao B, Li L, Lei Q, Guan KL. The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes Development*. 2010;24(9):862-874.
146. Zhao B, Ye X, Yu J, Li L, Li W, Li S, Yu J, Lin JD, Wang CY, Chinnaiyan AM, Lai ZC, Guan KL. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Development*. 2008;22(14):1962-1971.
147. Sawada A, Kiyonari H, Ukita K, Nishioka N, Imuta Y, Sasaki H. Redundant roles of Tead1 and Tead2 in notochord development and the regulation of cell proliferation and survival. *Molecular and Cellular Biology*. 2008;28(10):3177-3189.
148. Chan SW, Lim CJ, Loo LS, Chong YF, Huang C, Hong W. TEADs mediate nuclear retention of TAZ to promote oncogenic transformation. *Journal of Biology and Chemistry*. 2009;284(21):14347-14358.
149. Varelas X, Sakuma R, Samavarchi-Tehrani P, Peerani R, Rao BM, Dembowy J, Yaffe MB, Zandstra PW, Wrana JL. TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal. *Nature Cell Biology*. 2008;10(7):837-848.

150. Alarcon C, Zaromytidou AI, Xi Q, Gao S, Yu J, Fujisawa S, Barlas A, Miller AN, Manova-Todorova K, Macias MJ, Sapkota G, Pan D, Massague J. Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways. *Cell*. 2009;139(4):757-769.
151. Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiology Reviews*. 2014;94(4):1287-1312.
152. Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, Zanconato F, Le Digabel J, Forcato M, Bicciato S, Elvassore N, Piccolo S. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*. 2011;474(7350):179-U212.
153. Yu JZ, Zheng YG, Dong JX, Klusza S, Deng WM, Pan DJ. Kibra Functions as a Tumor Suppressor Protein that Regulates Hippo Signaling in Conjunction with Merlin and Expanded. *Developmental Cell*. 2010;18(2):288-299.
154. Hamaratoglu F, Willecke M, Kango-Singh M, Nolo R, Hyun E, Tao CY, Jafar-Nejad H, Halder G. The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nature Cell Biology*. 2006;8(1):27-U29.
155. Moleirinho S, Guarrant W, Kissil JL. The Angiotensins--from discovery to function. *FEBS Letter*. 2014;588(16):2693-2703.
156. Dupont S. Role of YAP/TAZ in cell-matrix adhesion-mediated signalling and mechanotransduction. *Experimental Cell Research*. 2016;343(1):42-53.
157. Varelas X, Samavarchi-Tehrani P, Narimatsu M, Weiss A, Cockburn K, Larsen BG, Rossant J, Wrana JL. The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF-beta-SMAD pathway. *Developmental Cell*. 2010;19(6):831-844.
158. Hirate Y, Hirahara S, Inoue K, Suzuki A, Alarcon VB, Akimoto K, Hirai T, Hara T, Adachi M, Chida K, Ohno S, Marikawa Y, Nakao K, Shimono A, Sasaki H. Polarity-dependent distribution of angiotensin localizes Hippo signaling in preimplantation embryos. *Current Biology*. 2013;23(13):1181-1194.
159. Matakatsu H, Blair SS. Separating planar cell polarity and Hippo pathway activities of the protocadherins Fat and Dachshous. *Development*. 2012;139(8):1498-1508.

160. Camargo FD, Gokhale S, Johnnidis JB, Fu D, Bell GW, Jaenisch R, Brummelkamp TR. YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells (vol 17, pg 2054, 2007). *Current Biology*. 2007;17(23):2094-2094.
161. Lee JH, Kim TS, Yang TH, Koo BK, Oh SP, Lee KP, Oh HJ, Lee SH, Kong YY, Kim JM, Lim DS. A crucial role of WW45 in developing epithelial tissues in the mouse. *Embo Journal*. 2008;27(8):1231-1242.
162. Pan D. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Developmental Cell*. 2010;19(4):491-505.
163. Fernandez A, Northcott PA, Dalton J, Fraga C, Ellison D, Angers S, Taylor MD, Kenney AM. YAP1 is amplified and up-regulated in hedgehog-associated medulloblastomas and mediates Sonic hedgehog-driven neural precursor proliferation. *Genes & Development*. 2009;23(23):2729-2741.
164. Song YM, Li L, Ou YW, Gao ZB, Li EM, Li XC, Zhang WM, Wang JQ, Xu LY, Zhou Y, Ma XJ, Liu LY, Zhao ZT, Huang XL, Fan J, Dong LJ, Chen G, Ma LY, Yang J, Chen LY, He MH, Li M, Zhuang XH, Huang K, Qiu KL, Yin GL, Guo GW, Feng Q, Chen PS, Wu ZY, Wu JY, Ma L, Zhao JY, Luo LH, Fu M, Xu BN, Chen B, Li YR, Tong T, Wang MR, Liu ZH, Lin DX, Zhang XQ, Yang HM, Wang J, Zhan QM. Identification of genomic alterations in oesophageal squamous cell cancer. *Nature*. 2014;509(7498):91-+.
165. Zender L, Spector MS, Xue W, Flemming P, Cordon-Cardo C, Silke J, Fan ST, Luk JM, Wigler M, Hannon GJ, Mu D, Lucito R, Powers S, Lowe SW. Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach. *Cell*. 2006;125(7):1253-1267.
166. Sekido Y. Inactivation of Merlin in malignant mesothelioma cells and the Hippo signaling cascade dysregulation. *Pathology International*. 2011;61(6):331-344.
167. St John MAR, Tao WF, Fei XL, Fukumoto R, Carcangiu ML, Brownstein DG, Parlow AF, McGrath J, Xu TA. Mice deficient of Lats1 develop soft-tissue sarcomas, ovarian tumours and pituitary dysfunction. *Nature Genetics*. 1999;21(2):182-186.
168. Lodge EJ, Russell JP, Patist AL, Francis-West P, Andoniadou CL. Expression Analysis of the Hippo Cascade Indicates a Role in Pituitary Stem Cell Development. *Frontiers in Physiology*. 2016;7:114.

169. Lodge EJ, Santambrogio A, Russell JP, Xekouki P, Jacques TS, Johnson RL, Thavaraj S, Bornstein SR, Andoniadou CL. Homeostatic and tumorigenic activity of SOX2+ pituitary stem cells is controlled by the LATS/YAP/TAZ cascade. *Elife*. 2019;8.
170. Xekouki P, Lodge EJ, Matschke J, Santambrogio A, Apps JR, Sharif A, Jacques TS, Aylwin S, Prevot V, Li R, Flitsch J, Bornstein SR, Theodoropoulou M, Andoniadou CL. Non-secreting pituitary tumours characterised by enhanced expression of YAP/TAZ. *Endocrinology Related Cancer*. 2019;26(1):215-225.
171. Grannas K, Arngarden L, Lonn P, Mazurkiewicz M, Blokzijl A, Zieba A, Soderberg O. Crosstalk between Hippo and TGFbeta: Subcellular Localization of YAP/TAZ/Smad Complexes. *Journal of Molecular Biology*. 2015;427(21):3407-3415.
172. Aragon E, Goerner N, Xi Q, Gomes T, Gao S, Massague J, Macias MJ. Structural basis for the versatile interactions of Smad7 with regulator WW domains in TGF-beta Pathways. *Structure*. 2012;20(10):1726-1736.
173. Ferrigno O, Lallemand F, Verrecchia F, L'Hoste S, Camonis J, Atfi A, Mauviel A. Yes-associated protein (YAP65) interacts with Smad7 and potentiates its inhibitory activity against TGF-beta/Smad signaling. *Oncogene*. 2002;21(32):4879-4884.
174. Kim NH, Lee Y, Yook JI. Disheveling Wnt and Hippo. *BMB Rep*. 2018;51(9):425-426.
175. Park HW, Kim YC, Yu B, Moroishi T, Mo JS, Plouffe SW, Meng Z, Lin KC, Yu FX, Alexander CM, Wang CY, Guan KL. Alternative Wnt Signaling Activates YAP/TAZ. *Cell*. 2015;162(4):780-794.
176. Goldstein SR, Siddhanti S, Ciaccia AV, Plouffe L, Jr. A pharmacological review of selective oestrogen receptor modulators. *Human Reproduction Update*. 2000;6(3):212-224.
177. Li Y, Schang G, Boehm U, Deng CX, Graff J, Bernard DJ. SMAD3 Regulates Follicle-stimulating Hormone Synthesis by Pituitary Gonadotrope Cells in Vivo. *Journal of Biology and Chemistry*. 2017;292(6):2301-2314.
178. Wu JC, Su P, Safwat NW, Sebastian J, Miller WL. Rapid, efficient isolation of murine gonadotropes and their use in revealing control of follicle-stimulating hormone by paracrine pituitary factors. *Endocrinology*. 2004;145(12):5832-5839.
179. Wen S, Schwarz JR, Niculescu D, Dinu C, Bauer CK, Hirdes W, Boehm U. Functional characterization of genetically labeled gonadotropes. *Endocrinology*. 2008;149(6):2701-2711.

180. Windle JJ, Weiner RI, Mellon PL. Cell lines of the pituitary gonadotrope lineage derived by targeted oncogenesis in transgenic mice. *Molecular Endocrinology*. 1990;4(4):597-603.
181. Alarid ET, Windle JJ, Whyte DB, Mellon PL. Immortalization of pituitary cells at discrete stages of development by directed oncogenesis in transgenic mice. *Development*. 1996;122(10):3319-3329.
182. Thomas P, Mellon PL, Turgeon J, Waring DW. The L beta T2 clonal gonadotrope: a model for single cell studies of endocrine cell secretion. *Endocrinology*. 1996;137(7):2979-2989.
183. Graham KE, Nusser KD, Low MJ. LbetaT2 gonadotroph cells secrete follicle stimulating hormone (FSH) in response to active A. *Journal of Endocrinology*. 1999;162(3):R1-5.
184. Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 1988;85(14):5166-5170.
185. Song AJ, Palmiter RD. Detecting and Avoiding Problems When Using the Cre-lox System. *Trends in Genetic*. 2018;34(5):333-340.
186. Xie H, Cherrington BD, Meadows JD, Witham EA, Mellon PL. Msx1 homeodomain protein represses the alphaGSU and GnRH receptor genes during gonadotrope development. *Molecular Endocrinology*. 2013;27(3):422-436.
187. Ben Mimoun S, Mauviel A. Molecular mechanisms underlying TGF-ss/Hippo signaling crosstalks - Role of baso-apical epithelial cell polarity. *International Journal of Biochemistry and Cellular Biology*. 2018;98:75-81.
188. Herbison AE. Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain Research Reviews*. 2008;57(2):277-287.
189. Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, Byquist AC, Crown A, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA, Tena-Sempere M. Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology*. 2007;148(4):1774-1783.
190. Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK, Steiner RA. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology*. 2005;146(7):2976-2984.
191. Childs GV. Growth hormone cells as co-gonadotropes: Partners in the regulation of the reproductive system. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2000;11(5):168-175.

192. Childs GV. Multipotential Pituitary-Cells That Contain Adrenocorticotropin (Acth) and Other Pituitary-Hormones. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 1991;2(3):112-117.
193. Fukami K, Tasaka K, Mizuki J, Kasahara K, Masumoto N, Miyake A, Murata Y. Bihormonal cells secreting both prolactin and gonadotropins in normal rat pituitary cells. *Endocrine Journal*. 1997;44(6):819-826.
194. Nunez L, Villalobos C, Senovilla L, Garcia-Sancho J. Multifunctional cells of mouse anterior pituitary reveal a striking sexual dimorphism. *Journal of Physiology*. 2003;549(Pt 3):835-843.
195. Dong L, Lin F, Wu W, Liu Y, Huang W. Verteporfin inhibits YAP-induced bladder cancer cell growth and invasion via Hippo signaling pathway. *Int J Med Sci*. 2018;15(6):645-652.
196. Gibault F, Bailly F, Corvaisier M, Coevoet M, Huet G, Melnyk P, Cotelle P. Molecular Features of the YAP Inhibitor Verteporfin: Synthesis of Hexasubstituted Dipyrins as Potential Inhibitors of YAP/TAZ, the Downstream Effectors of the Hippo Pathway. *ChemMedChem*. 2017;12(12):954-961.
197. Liu-Chittenden Y, Huang B, Shim JS, Chen Q, Lee SJ, Anders RA, Liu JO, Pan D. Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes Development*. 2012;26(12):1300-1305.
198. Fortin J, Kumar V, Zhou X, Wang Y, Auwerx J, Schoonjans K, Boehm U, Boerboom D, Bernard DJ. NR5A2 regulates Lhb and Fshb transcription in gonadotrope-like cells in vitro, but is dispensable for gonadotropin synthesis and fertility in vivo. *PLoS One*. 2013;8(3):e59058.
199. Thackray VG, Mellon PL, Coss D. Hormones in synergy: regulation of the pituitary gonadotropin genes. *Molecular Cell Endocrinology*. 2010;314(2):192-203.
200. Alim Z, Hartshorn C, Mai O, Stitt I, Clay C, Tobet S, Boehm U. Gonadotrope Plasticity at Cellular and Population Levels. *Endocrinology*. 2012;153(10):4729-4739.
201. Navratil AM, Dozier MG, Whitesell JD, Clay CM, Roberson MS. Role of Cortactin in Dynamic Actin Remodeling Events in Gonadotrope Cells. *Endocrinology*. 2014;155(2):548-557.
202. Seo J, Kim J. Regulation of Hippo signaling by actin remodeling. *Bmb Reports*. 2018;51(3):151-156.

203. Nicol L, McNeilly JR, Stridsberg M, Crawford JL, McNeilly AS. Influence of steroids and GnRH on biosynthesis and secretion of secretogranin II and chromogranin A in relation to LH release in LbetaT2 gonadotroph cells. *Journal of Endocrinology*. 2002;174(3):473-483.
204. Clay CM, Cherrington BD, Navratil AM. Plasticity of Anterior Pituitary Gonadotrope Cells Facilitates the Pre-Ovulatory LH Surge. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. 2020;11:616053.
205. Edwards BS, Dang AK, Murtazina DA, Dozier MG, Whitesell JD, Khan SA, Cherrington BD, Amberg GC, Clay CM, Navratil AM. Dynamin Is Required for GnRH Signaling to L-Type Calcium Channels and Activation of ERK. *Endocrinology*. 2016;157(2):831-843.